Aus dem Institut für Physiologische Chemie der
Philipps-Universität in Marburg

Direktor: Prof. Dr. Dr. P. Karlson

Transkription der Gene für ribosomale 5S RNA an isoliertem HeLa-Chromatin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

DAGMAR JONAS

aus Haldensleben

Marburg 1979

Druck: Mauersberger, Marburg

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der
Philipps-Universität in Marburg

Direktor: Prof. Dr. Dr. P. Karlson

Transkription der Gene für ribosomale 5S RNA an isoliertem HeLa-Chromatin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

DAGMAR JONAS

aus Haldensleben

Marburg 1979

Druck: Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Universität Marburg am 1o.1.1979

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. F. Neurath

Referent: Prof. Dr. Dr. P. Karlson

Korreferent: Prof. Dr. Dr. K.H. Seifart

Die vorliegende Arbeit wurde am
Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität in Marburg
unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. Dr. K.H. Seifart
angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Dr. K.H. Seifart möchte
ich für Unterstützung und anregende
Diskussionen danken.

Ebenfalls danke ich dem Direktor des
Instituts für Physiologische Chemie,
Herrn Prof. Dr. Dr. P.Karlson, für
die Förderung der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis Seite

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	13
2.1.	Material	13
2.2.	Methoden	16
2.2.1.	Kultur der Plasmid-DNA-haltigen E. coli Stämme	16
2.2.2.	Isolierung der Plasmid-DNA	18
2.2.3.	Beladen der Nitrocellulosefilter mit Plasmid-DNA	18
2.2.4.	Isolierung der RNA-Polymerasen A, B und C aus HeLa-Zellen, Ascites-Zellen und Rattenleberkernen	19
2.2.5.	Prüfung der RNA-Polymerasen auf Aktivität, Reinheit und Nucleasen	22
2.2.6.	Präparation von HeLa-Kernen und Chromatin	23
2.2.7.	RNA-Synthese in isolierten HeLa-Kernen und Chromatin	25
2.2.8.	DNA-RNA-Hybridisierung der in vitro synthetisierten RNA	27
2.2.9.	Gelfiltration der in vitro synthetisierten RNA auf Sephadex G 100	28
2.2.10.	Elektrophorese der in vitro synthetisierten RNA auf formamidhaltigen Polyacrylamidgelen	28
2.2.11.	Oligonucleotidanalyse der in vitro synthetisierten 5S RNA nach Verdauung mit RNase T1.	29
2.2.12.	Präparation von in vivo ^{3}H- oder ^{32}P-markierter rRNA, 5S RNA und tRNA aus HeLa-Zellen	30
2.2.13.	Präparation von 5S RNA aus Rattenleberribosomen	31
2.2.14.	Präparation von hochmolekularer DNA aus HeLa-Zellkernen	31
3.	Ergebnisse	34
3.1.	Transkription von ribosomaler 5S RNA in isolierten HeLa-Zellkernen	34
3.1.1.	Optimierung der Synthesebedingungen	34
3.1.2.	Quantitierung der 5S RNA-Synthese in isolierten HeLa-Kernen	36
3.1.3.	Größenanalyse der in vitro synthetisierten RNA	37

Seite

3.1.3.1. Größenfraktionierung der in vitro RNA durch Gelfiltration auf Sephadex G 100 — 38

3.1.3.2. Größenfraktionierung der in vitro RNA auf Polyacrylamidgelen — 38

3.1.4. Kompetitionshybridisierung der in vitro ^{3}H-RNA — 41

3.1.5. Oligonucleotidanalyse von in vitro synthetisierter 5S RNA nach Inkubation mit Ribonuclease T1. — 43

3.2. Transkription von ribosomaler 5S RNA an isoliertem HeLa-Chromatin durch endogene RNA-Polymerasen — 45

3.2.1. Präparation des Chromatins — 45

3.2.2. Kinetik der Synthese von 5S RNA durch endogene RNA-Polymerasen in isoliertem HeLa-Chromatin — 45

3.2.3. Salzabhängigkeit der 5S RNA-Synthese in HeLa-Chromatin — 47

3.2.4. Synthese von 5S RNA in HeLa-Chromatin in Abwesenheit und Gegenwart von Heparin — 48

3.2.5. Größenanalyse der in vitro synthetisierten RNA — 52

3.3. Transkription von ribosomaler 5S RNA in HeLa-Chromatin durch exogene RNA-Polymerasen — 55

3.3.1. Transkription von isoliertem HeLa-Chromatin durch E. coli Polymerase — 55

3.3.2. Transkription von ribosomaler 5S RNA mit exogener HeLa-Polymerase C — 59

3.3.2.1. Polymerase A-haltiges Enzym C — 59

3.3.2.2. Transkription der 5S RNA-Gene in vitro durch gereinigte exogene Polymerase C und ihre Unterformen C_1 und C_2 — 62

3.3.2.3. Hybridisierung der an Chromatin synthetisierten 5S RNA an vorhybridisierte DNA-Filter — 66

3.3.2.4. Titration von HeLa-Chromatin mit exogener Polymerase C — 68

3.3.3. Vergleichende Transkription von HeLa-Chromatin mit den gereinigten RNA-Polymerasen A, B und C aus HeLa-Zellen, Rattenleberkernen und Ascites-Zellen und mit E. coli Polymerase — 71

		Seite
3.4.	Transkription von gereinigter hochmolekularer HeLa-DNA mit HeLa-Polymerase A und C und mit E. coli Polymerase	73
4.	Diskussion	76
5.	Zusammenfassung	91
6.	Verzeichnis der Abkürzungen	94
7.	Literaturverzeichnis	95

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546027_0032

1. Einleitung

Lebende Organismen sind Systeme, die zur Reproduktion befähigt sind. Das dazu notwendige Informationsmaterial ist in jeder Zelle gleichermaßen in Form von DNA gespeichert, die sich einerseits selbst reduplizieren kann und andererseits die Matrize - allerdings nur mittelbar - für die Synthese der einzelnen Proteine darstellt. Als Vermittler fungiert dabei die durch die RNA-Polymerase von bestimmten DNA-Abschnitten (Genen) synthetisierte und zu diesen komplementäre mRNA, durch die die an DNA in stationärer Form vorhandene Information in ihre Transportform umgewandelt und aus dem Zellkern an den Ort der Proteinsynthese befördert wird. Weiterhin in die Proteinsynthese einbezogen, ohne aber selbst in Proteine translatiert zu werden, sind die tRNA als Träger der Aminosäuren und die ribosomalen RNAs (18S, 28S und 5S RNA) als Strukturelemente der Ribosomen.

Obwohl jede Zelle den gleichen Informationsgehalt trägt, wird dieser in den einzelnen Zellen unterschiedlich genutzt. Besonders auffällig wird dies in den ausdifferenzierten und funktionell voneinander verschiedenen Zellen höherer eukaryonter Organismen, in denen sich das Protein- und RNA-Muster stark unterscheidet. Weiterhin treten bei in Kultur wachsenden Zellen zeitabhängig innerhalb einer Zelle Veränderungen im RNA-Muster ein. Drittens reagieren Zellen auf zusätzliche äußere Reize (Kulturmedium, Hormongaben, Verletzungen) mit einer Änderung der RNA Synthese.

Es muß offenbar Regulationsmechanismen geben, die erstens bestimmen, zu welchem Zeitpunkt bestimmte Gene in den einzelnen Zellen transkribiert werden, und zweitens zu einer Bindung der RNA-Polymerase an die korrekten Initiationsstellen der betreffenden Gene führen. Diese Mechanismen sind für Eukaryonten fast völlig ungeklärt, während die Zusammenhänge bei den strukturell wesentlich einfacheren Prokaryonten schon zu einem Teil bekannt sind.

Transkriptionskontrolle bei Prokaryonten

1961 haben Jacob und Monod ein Modell entwickelt, mit dem sie die Anpassung der Expression prokaryonter Gene an die äußeren Bedingungen erklären konnten. Demnach ist jeder Gengruppe für funktionell zusammengehörige Enzyme eine Kontrolleinheit direkt vorgelagert, die aus Promoter und Operator besteht. Den gesamten Komplex bezeichnet man als Operon. Der Promoter enthält das Startsignal, er ist gleichzeitig die Bindungsstelle für die RNA-Polymerase. Der Operator, der zwischen Promoter und Genanfang liegt, ist die Bindungsstelle für ein zusätzliches, für jedes Operon spezifisches regulatorisches Protein, den Repressor. Ein an den Operator gebundener Repressor macht die Transkription der betreffenden Gene duch die Polymerase unmöglich. Je nachdem ob es sich bei der betreffenden Gengruppe um Gene für katabole oder anabole Enzyme handelt, wird der Repressor durch die An- oder Abwesenheit von Enzymsubstrat vom Operator gelöst und die Transkription der Gene möglich. In den letzten Jahren konnte dieses Modell bestätigt werden; es ist gelungen, einige Komponenten der Kontrollregion prokaryonter Operons zu isolieren und zu sequenzieren, darunter Promoter- und Operatorsequenzen und Repressoren aus E. coli und Phagen. Bei allen bisher sequenzierten Promotoren stellen die Bindungsstellen für die RNA Polymerase AT-reiche Gruppen von 7 Nucleotidpaaren dar, die im wesentlichen Abkömmlinge der Sequenz 5' TATPuATG sind und 6-7 Nuc-
3' ATAPyTAC
leotide vor dem Initiationspunkt der RNA-Synthese liegen. Der E. coli Zelle steht zur Transkription sämtlicher RNA-Spezies eine einzige Form der RNA-Polymerase zur Verfügung. Diese setzt sich aus mehreren Untereinheiten zusammen, die mit $\alpha\beta\beta'\omega$ und 6 bezeichnet werden, und hat ein Molekulargewicht von 500000. Die Gruppierung $\alpha\beta\beta'\omega$ bildet das "core enzyme", das für die Polymerisationsreaktion notwendig ist. Für die Erkennung bestimmter Nucleotidsequenzen auf der DNA als Startsignale für die Transkription ist das Hinzutreten einer dissoziierbaren 6-Untereinheit erforderlich.

Der Transkriptionsprozeß gliegert sich in drei Abschnitte:

Initiation

Die E. coli RNA-Polymerase bindet unter Einwirkung der 6-Untereinheit an die Promotoren. Zwischen den ersten beiden Ribonucleotiden wird unter Abspaltung eines Pyrophosphatrestes die erste Phosphodiesterbindung gebildet. Die 6-Untereinheit ist lediglich für diesen Initiationsprozeß notwendig. Sie dissoziiert danach vom Transkriptionkomplex ab und verhilft einem weiteren Polymerasemolekül zur Initiation.

Elongation

Das "core enzyme" wandert unter Verlängerung der RNA-Kette an der DNA entlang. Jedes neu einzubauende Nucleotid wird dabei mit dem letzten 3'-OH der wachsenden Kette verbunden. Da die RNA vom 5'-Ende aus zum 3'-Ende hin synthetisiert wird, bleibt das 5'-terminale Nucleotid, das immer Adenin oder Guanin ist, als Triphosphat erhalten.

Termination

Wie für die Initiation der RNA-Synthese, so existieren auch für die Termination bestimmte Basensequenzen auf der DNA, die einen Kettenabbruch zur Folge haben. Als zweite Möglichkeit existiert eine Termination, die durch das Hinzutreten eines Proteinfaktors ρ ausgelöst wird.

Transkriptionskontrolle in Eukaryonten

Eukaryonte Organismen unterscheiden sich in ihren molekularen Grundlagen in mehreren Punkten beträchtlich von den Prokaryonten und es hat sich bis jetzt noch kein Anhalt dafür finden lassen, daß ein ähnliches Modell für die Regulation der Transkription, wie das von Jacob und Monod für Prokaryonten entwickelte, auch auf Eukaryonten übertragen werden kann. Während an prokaryonte DNA lediglich einige basische Proteine vergleichsweise schwach gebunden sind, ist die eukaryonte DNA fest komplexiert mit chromodomalen Proteinen und bildet Nucleoproteinfibern, die als Chromatin bezeichnet werden. Die Bestandteile des Chromatins sind neben der DNA

5 verschiedene basische Proteinspezies, die Histone (H_1, H_{2A}, H_{2B}, H_3, H_4), eine etwa gleiche Menge saurer Proteine und ein geringer Anteil von niedermolekularer RNA.

Die Histone, die in allen eukaryonten Organismen im wesentlichen die gleiche Struktur besitzen, bilden mit der DNA regelmäßig gebaute, kugelförmige Struktureinheiten, die Nucleosomen, die perlschnurartig hintereinander gereiht sind (Olins und Olins, 1974). Jedes Nucleosom enthält im Kern je zwei Moleküle H_{2A}, H_{2B}, H_3 und H_4, um die die DNA in einer Länge von 200 Basenpaaren spiralig gewunden ist, und ist von den Nachbarnucleosomen durch kurze DNA-Abschnitte getrennt, an die je ein Molekül H_1 angelagert ist. Die sauren chromosomalen Proteine sind mehr oder weniger fest an die DNA gebunden und umfassen ca. 100 verschiedene Proteinspezies, unter ihnen die DNA- und RNA-Polymerasen. Die Zusammensetzung der Gruppe der sauren Proteine wechselt je nach dem Zelltyp.

Verschiedene Autoren konnten in den Jahren 1962-1968 zeigen, daß die Matrizenaktivität der proteinfreien eukaryonten DNA mit E. coli Polymerase in Chromatin auf 5-15% sinkt, indem sie entweder die RNA-Syntheseraten verglichen (Marushige und Bonner, 1966) oder die in vitro RNA gegen nucleare homologe DNA hybridisierten (Paul und Gilmour, 1966). Überdies unterschied sich das RNA-Muster der neusynthetisierten RNA bei unterschiedlich differenzierten Zelltypen, wenn Chromatin als Matrize verwendet wurde, während mit proteinfreier DNA als Matrize kein Unterschied festzustellen war (Paul und Gilmour, 1968; Axel et al., 1973). Allerdings wurde später erkannt, daß unter den angewendeten Hybridisierungsbedingungen lediglich die RNA erfaßt wurde, die von repetetiven Sequenzen synthetisiert wurde (Reeder, 1973), so daß eigentlich keine Aussage hinsichtlich der Unterschiede in der Synthese der informativen mRNA gemacht werden konnte. Von Bedeutung in diesem Zusammenhang ist weiterhin, daß alle diese Experimente an Eukaryonten mit der heterologen E. coli Polymerase ausgeführt wurden, da diese zu jener Zeit als einzige in gereinigter Form zur Verfügung stand.

1973 haben Cedar und Felsenfeld gezeigt, daß die am Chromatin gegenüber DNA stark verringerte RNA-Synthese auf einer Abnahme der zur Verfügung stehenden Initiationsstellen um 90% beruht. Sie bedienten sich dafür eines Transkriptionssystems, in dem sie Initiation und Elongation getrennt untersuchen konnten. Auch diese Versuche wurden zuerst mit E. coli Polymerase durchgeführt; ein anloges Bild ergab sich aber später mit homologer eukaronter Polymerase B (Cedar, 1975). Dabei stellte sich heraus, daß die Bindungsstellen für die E. coli Polymerase nicht mit denen für die eukaryonte Polymerase identisch sind. Das im Chromatin enthaltene Protein bedeckt also Teile der DNA so, daß sie für die Transkription blockiert sind. Die Variabilität der sauren chromosomalen Proteine in den verschiedenen Zelltypen legt den Schluß nahe, daß sie eine Aufgabe bei der Regulation der Transkription übernehmen. Ob auch die Histone hierbei eine Rolle spielen, ist noch nicht geklärt. Einerseits konnte gezeigt werden, daß die spezifische Blockierung der Transkription im Chromatin zusammenbricht, wenn man die Histone von der DNA ablöst, ohne die sauren chromosomalen Proteine zu entfernen (Marushige und Bonner, 1966). Andererseits aber kann die notwendige Flexibilität eines genetischen Kontrollsystems schwer mit der Monotonie der Histonmoleküle in Einklang gebracht werden, da schon in den Prokaryonten eine große Anzahl von Repressoren für die Regulation der Transkription notwenig sind.

Im Gegensatz zu den Prokaryonten besitzen die höheren Eukaryonten 3 verschiedene Klassen von RNA-Polymerasen, die mit A, B und C bzw. mit I, II und III bezeichnet werden und ihrerseits wiederum aus 2-3 Unterklassen bestehen. Diese Enzyme können durch chromatographische Verfahren voneinander getrennt werden und lassen sich auf Grund ihrer verschiedenen Empfindlichkeit gegenüber dem Pilzgift α-Amanitin unterscheiden. Sie sind für die Transkription ganz bestimmter und in ihrer Funktionen unterschiedlicher RNA-Klassen zuständig.

Polymerase A

Diese nur im Nucleolus vorkommende Form (Roeder und Rutter, 1970) ist gegen α-Amanitin resistent (Kedinger et al., 1970; Lindell et al., 1970) und katalysiert die Synthese einer einzigen RNA-Spezies, der 45S RNA, die der Vorläufer der ribosomalen 18S und 28S RNA ist (Reeder und Roeder, 1972).

Polymerase B,
läßt sich schon durch sehr geringe α-Amanitinkonzentrationen (10^{-8}-10^{-9} M) hemmen und synthetisiert die sehr heterogene Klasse der hnRNA, die wahrscheinlich die Vorstufe der zytoplasmatischen mRNA darstellt (Blatti et al., 1970; Zylber und Penman, 1971). Außerdem ist Polymerase B an der Transkription früher und später viraler mRNA während der Infektion eukaryonter Zellen mit tierischen DNA-Viren beteiligt (Price und Penman, 1972a; Weinmann et al., 1974).

Polymerase C,
zeigt eine mittlere Empfindlichkeit gegenüber α-Amanitin (10^{-4}-10^{-5} M) (Seifart et al., 1972) und ist wie Polymerase B im Nucleoplasma lokalisiert (Seifart und Benecke, 1975; Austoker et al., 1974; Wilhelm et al., 1974), konnte aber auch aus dem Zytoplasma isoliert werden (Seifart et al., 1972; Amalric et al., 1972). Polymerase C transkribiert die niedermolekularen RNA-Spezies, d.h. 5S RNA und prä-tRNA (Price und Penman, 1972b; Weinmann und Roeder, 1974). Zusätzlich ist Polymerase C involviert in die Transkription von viraler 5,5S RNA, die während der späten Phase der produktiven Infektion von KB- und HeLa-Zellen mit Adenovirus 2 auftritt (Weinmann et al., 1974; Price und Penman, 1972b).

Die eukaryonten RNA-Polymerasen sind wie die E. coli Polymerase oligomere Enzyme mit Molekulargewichtn von 400000, 500000 und 650000 für die Enzyme A, B und C. Sie bestehen aus 6 (Enzym A), 8 (Enzym B) und 10 (Enzym C) stark assoziierten Untereinheiten, von denen je zwei ein Molekulargewicht von über 100000 besitzen. Die heterogenen Formen innerhalb einer Enzymklasse unterscheiden sich nur in einer der Untereinheiten voneinander (Schwartz und Roeder, 1974;

Kedinger et al., 1974; Krebs und Chambon, 1976; Schwartz und Roeder, 1975; Weaver et al., 1971; Sklar und Roeder, 1976). Wenn auch gewisse Ähnlichkeiten im Aufbau zu erkennen sind, so differieren die meisten der Untereinheiten einer Enzymklasse hinsichtlich der Größe deutlich von denen der anderen beiden Klassen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß die verschiedenen Enzyme primär aus unterschiedlichen Genprodukten zusammengesetzt sind und damit auch unabhängig von einander reguliert werden können.

Die selektive Transkription bestimmter Regionen des eukaryonten Genoms scheint demnach auf mindestens zwei verschiedenen Ebenen reguliert zu werden. Gewisse transkriptionelle Kontrollen werden durch eine Änderung in der Chromatinstruktur ausgeübt, und andere durch die strukturell und funktionell unterschiedlichen RNA-Polymerasen. Änderungen in der Proteinzusammensetzung des Chromatins gehen einher mit einer Freilegung bzw. Blockierung der Initiationsstellen bestimmter Gene. Eine Regulation über die RNA-Polymerasen ist insofern denkbar, als diese möglicherweise spezifische Sequenzen erkennen, die für ein Gen bzw. für eine Genklasse charakteristisch sind.

Wie schon erwähnt, transkribieren die drei RNA-Polymerasen RNA-Gruppen ganz verschiedenen Charakters und äußerst unterschiedlicher Heterogenität. Auch unterscheidet sich die Struktur der Gene für diese einzelnen RNA-Klassen stark voneinander. Während die Gene für die Struktur-RNAs, die von Polymerase A und C transkribiert werden, von Spacersequenzen unterbrochen mehrere 100-1000mal hintereinander gereiht sind, liegen die Gene für die verschiedenen mRNAs nur in einzelnen bzw. wenigen Kopien vor, mit der einzigen Ausnahme der Gene für die Histon-mRNA (Kedes und Birnstiel, 1971). Der Grund dafür ist wahrscheinlich, daß die Zahl der RNA-Moleküle, die ein Gen produzieren kann, durch die Transkriptionsrate begrenzt wird, während die Zahl der Proteinmoleküle, die von einem Gen synthetisiert werden kann, auf zwei Stufen beeinflußt werden kann, durch die Produktion vieler RNA-Moleküle von einem Gen und vieler Proteinmole-

küle von jedem einzelnen dieser RNA-Moleküle. Zieht man in Betracht, daß die wenigen Spezies der Struktur-RNAs in jeder Zelle transkribiert werden, wenn auch in verschiedenem Ausmaß, während die heterogene mRNA-Population von Zelltyp zu Zelltyp differiert, so liegt die Vermutung nahe, daß die Bedeutung der chromosomalen Proteine bei der Regulation der Transkription für die Gruppe der mRNA-Gene besonders groß sein muß. Allein durch die RNA-Polymerase B und ihre Unterformen ist eine ausreichende Kontrolle nicht denkbar. Dagegen wäre es möglich, daß die Spezifität der Transkription der repetetiven Gene weitgehend oder ausschließlich durch die Polymerasen geregelt wird.

Transkription in vitro

Welche Faktoren die Selektivität der Transkription der einzelnen Gene beeinflussen, kann nur durch in vitro Versuche geklärt werden. Dabei kann man zwei verschiedene Wege einschlagen. Mit einem Transkriptionssystem aus gereinigter RNA-Polymerase und hochgereinigter, proteinfreier DNA läßt sich ermitteln, ob und in wie weit die Spezifität der Transkription allein auf DNA-RNA-Polymerase Wechselwirkungen beruht. Geht man dagegen von der Prämisse aus, daß spezifische chromosomale Proteine unbedingt notwendig sind für eine selektive Genaktivierung, kommt nur Chromatin als Matrize in Frage, entweder in Zellkernen oder in isolierter Form.

Eine selektive Transkription in vitro muß die folgenden Merkmale erfüllen:

1. Präferentielle Transkription des betreffenden Gens durch die RNA-Polymerase, die die gleichen Gene in vivo transkribiert.
2. Korrekte Länge des in vitro Produkts, d.h. selektive Initiation und Termination.
3. Strangselektivität (asymmetrische Transkription)

Qualitative und quantitative Analyse der in vitro gebildeten RNA auf bestimmte RNA-Sequenzen ist durch DNA-RNA-Hybridisierung möglich, wobei als DNA entweder die isolierten DNA-

Sequenzen (für Transkripte repetetiver Gene) oder cDNA eingesetzt wird (für rein darstellbare mRNAs). Da reine cDNA nur von hochgereinigter mRNA-Spezies erhalten werden kann, müssen sich die Transkriptionsstudien für mRNA auf solche Systeme beschränken, die in vivo eine spezielle mRNA bevorzugt transkribieren (Globin-, Ovalbumin-, Seidenfibroin-mRNA).

Die Analyse der in vitro Transkripte bestimmter mRNA-Gene aber wirft gravierende Probleme auf. Zum einen muß eine Hybridisierung an cDNA, die immer radioaktiv markiert ist, mit unmarkierter mRNA erfolgen, wobei es dann schwierig wird, zwischen in vivo und in vitro synthetisierter mRNA zu unterscheiden. Durch die Einführung der Markierung der in vitro synthetisierten RNA mit Hg-UTP (Dale und Ward, 1975) wurde es aber möglich, die endogene RNA von in vitro synthetisierter RNA zu trennen.

Viel entscheidender aber ist, daß eine Prüfung der in vitro synthetisierten RNA auf korrekte Länge bisher noch nicht möglich ist. Dies hat u.a. seine Ursache darin, daß das hochmolekulare Primärtranskript der mRNA-Gene, die hnRNA, deren Struktur für keine mRNA bekannt ist, bis zur Bildung der reifen zytoplasmatischen mRNA tiefgreifenden posttranskriptionellen Prozessierungsschritten unterworfen ist, zu denen das "Capping" am 5'-Terminus, das Anfügen von Poly(A) an das 3'-Ende gehören und besonders das seit kurzem als "Splicing" bekannte Phänomen. Letzteres beinhaltet ein Zusammenfügen mehrerer über das Primärtranskript verteilter Sequenzen unter Herausschneiden großer Teile von sogenannten "intervening sequences".

Untersuchungen zur Transkription von mRNA mußten sich deshalb auf die Fragestellung beschränken, ob die betreffende mRNA in vitro präferentiell transkribiert wird. In fast allen Untersuchungen wurde Chromatin als in vitro System gewählt und als Polymerase wegen der niedrigen Polymerase B Aktivität in Chromatin die E. coli Polymerase. Aus den Versuchen der ersten Jahre, die in Unkenntnis der oben dargestellten Komplexizität der Prozessierung der Transkripte

der mRNA-Gene durchgeführt wurden, ergab sich als Essenz, daß E. coli Polymerase die mRNA-Gene zwar präferentiell abliest, aber auch anticodogene Sequenzen transkribiert (Gilmour und Paul, 1973; Axel et al., 1973; Wilson et al., 1975). Nach Einführung der Hg-UTP Technik berichteten noch mehrere Gruppen über präferentielle Transkription der Gene für Globin-mRNA (Crouse et al., 1976), mRNA für die leichte Kette des Immunoglobulins (Smith und Huang, 1976), Histon-mRNA (Stein et al., 1975) und Ovalbumin-mRNA (Towle et al., 1977). Die Signifikanz aller dieser Daten ist aber durch Ergebnisse von Zasloff und Felsenfeld (1977) und Giesecke et al., 1977) ins Wanken geraten. Diese Gruppen haben nachgewiesen, daß E. coli Polymerase in isoliertem Chromatin auch endogene mRNA als Matrize zur Synthese von Anti-mRNA verwenden kann, die mit der endogenen mRNA Hybride bildet, was je nach Isolierungs- und Nachweisverfahren der mRNA-Sequenzen zur Überschätzung der in vitro synthetisierten mRNA (bei Markierung mit Hg-UTP) oder zur fälschlichen Detektion von Anti-mRNA führt.

Die einzigen positiven Berichte bezüglich der Transkription bestimmter mRNAs in vitro beziehen sich auf endogene Polymerase B in isolierten Kernen. Suzuki und Giza (1976) berichteten, daß endogene Polymerase B die Synthese von Seidenfibroin-mRNA in Kernen von Bombyx mori veranlaßt. Ähnliche Ergebnisse wurden durch andere Arbeitsgruppen für Globin-mRNA (Orkin, 1978), Ovalbumin-mRNA (Nguyen-Huu et al., 1978), Histon-mRNA (Detke et al., 1978) und virale mRNAs (Price und Penman, 1972; Weinmann et al., 1974; Bitter und Roeder, 1978) gefunden. In allen diesen Fällen wurde aber lediglich die Elongation bereits in vivo initiierter RNA-Ketten gemessen, da Reinitiation von Polymerase B in vitro wenn überhaupt dann nur zu einem sehr geringen Teil möglich ist.

Aussichtsreicher scheint die Situation bei der Transkription repetetiver Gene zu sein. Posttranskriptionelle Prozesse, soweit überhaupt vorhanden, beschränken sich auf ein Minimum und beinhalten lediglich eine Spaltung des Primärtranskripts

in kleinere RNA-Ketten. Die Struktur der Primärtranskripte ist, wenn auch nicht in allen Fällen exakt, so doch in groben Zügen bekannt, so daß eine Analyse des in vitro Transkripts auf Korrektheit einfacher wird.

So ist es zwei Arbeitsgruppen gelungen, selektive präferentielle Transkription der Gene für 18S und 28S RNA von hochmolekularer, proteinfreier Hefe-DNA durch die homologe Polymerase A nachzuweisen, was einen gewissen Grad der Spezifität der Transkription allein durch die Polymerase A vermuten läßt. Hier scheint es sich jedoch um einen Spezialfall für Hefe zu handeln. Auch wurden in beiden Untersuchungen keinerlei Aussagen über Initiationsstellen und Stranselektivität gemacht (van Keulen et al., 1975; Holland et al., 1977).

Analog zu den Versuchen mit Polymerase B konnten Reeder und Roeder (1972) zeigen, daß die rDNA im isolierten Kernsystem von endogener Polymerase A transkribiert wird. Wie für Polymerase B war auch hier der entscheidende Nachteil, daß Polymerase A nicht in der Lage ist, die RNA-Synthese zu reinitieren, so daß keine Aussagen über die Korrektheit der Initiation möglich waren.

Die Verwendung exogener E. coli Polymerase (Reeder, 1973) und homologer Polymerasen A und B (Honjo und Reeder, 1974) am isolierten Chromatin von Xenopus laevis erbrachten, daß alle drei Polymerasen die rDNA transkribierten, aber unspezifisch. Sowohl Spacer- als auch anticodogene Sequenzen wurden abgelesen. Ob diese fehlende Spezifität der Transkription durch exogene Polymerase A eine Funktion des in vitro Systems war (Verlust von chromosomalen Proteinen) oder ob die RNA-Polymerasen bei der Isolierung Inaktivierung oder Verlust von Untereinheiten bzw. begleitenden regulatorischen Faktoren erlitten, kann wegen der fehlenden Reinitiation der endogenen Polymerase A nicht entschieden werden.

Im Gegensatz dazu ist für endogene Polymerase C beschrieben worden, daß sie die Synthese der von ihr in vivo synthetisierten RNA-Spezies (5S RNA und tRNA) auch in vitro - in

isolierten Kernen und Chromatin - über einen längeren Zeitraum und unter ständiger Reinitiation aufrecht erhält (Marzluff et al., 1974; Marzluff und Huang, 1975). Dadurch wird die Möglichkeit gegeben, zu untersuchen, welche Faktoren die Spezifität der Transkription dieser RNAs beeinflussen. Wegen zweier weiterer Vorzüge bietet sich vor allem das HeLa-5S System, das auch in der vorliegenden Arbeit gewählt wurde, für solche Untersuchungen an. HeLa-5S RNA unterliegt nach der Transkription keinen weiteren posttranskriptionellen Prozessierungsschritten und ihre Nucleotidsequenz ist genau bekannt (Hatlen et al., 1969; Vigne und Jordan, 1977), so daß die Korrektheit der in vitro synthetisierten 5S RNA leicht überprüft werden kann. Außerdem existieren Plasmide, die die Gene für 5S RNA von Xenopus laevis und Xenopus mulleri tragen, die einen sehr hohen Grad der Homologie mit den HeLa-Genen aufweisen. So ist es möglich, die Gene in den Mengen zu isolieren, die nötig sind für die DNA-RNA-Hybridisierungen zur eindeutigen Analyse der in vitro RNA.

Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war, ein in vitro System zu entwickeln, in dem 5S RNA über einen längeren Zeitraum transkribiert wird, und in diesem die Spezifität der Transkription durch die endogene Polymerase C zu überprüfen. Als in vitro Systeme wurden HeLa-Kerne und HeLa-Chromatin gewählt. Anschließend daran sollten in isoliertem Chromatin auch exogene Polymerasen homologen und heterologen Ursprungs hinsichtlich der Transkriptionsspezifität untersucht werden.

Wenn es sich bei dem 5S RNA-System auch um einen Spezialfall handeln mag, so besteht doch die Aussicht, daß durch die Erhellung der transkriptionellen Regulationsmechanismen für diese RNA auch Rückschlüsse auf andere Systeme gezogen werden können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Das Radiochemical Center (Amersham) lieferte ^{3}H-Uridintriphosphat (13-27 Ci/mmol), 5'-^{3}H-Uridin (5 Ci/mmol), ^{32}P-Uridintriphosphat (2000 Ci/mmol), ^{32}P als Orthophosphat (100 Ci/mg Phosphat).

Von Boehringer (Mannheim) wurden bezogen:
E. coli RNA-Polymerase (E.C.2.7.7.6), Lysozym, tRNA aus E. coli, α-Amanitin, Nucleotidtriphosphate, Ribonuclease T 1 (E.C.2.7.7.26)

Sigma (St. Louis) lieferte:
Thiamin-HCl, DL-Dithiothreitol (DTT), Tetracyclin, Chloramphenicol.

Weiter wurden bezogen:
Polyvinylsulfat, Na-dodecylsulfat (SDS), Sucrose (RNase-frei), Triton X 100, Amberlite MB I, N,N,N',N' - Tetramethyläthylendiamin (TEMED) von Serva (Heidelberg).

Ribonuclease A (E.C.2.7.7.16), Desoxyribonuclease I (RNase frei) (E.C.3.1.4.5) von Worthington.

Kalbsthymus-DNA von Calbiochem (Los Angeles).

Nitrocellulose-Filter (Selectron BA 85) von Schleicher und Schüll (Dassel).

DEAE-Sephadex A 25, Sephadex G 100 medium von Pharmacia (Uppsala).

DEAE-Cellulose DE-32 (1meq/g) von Whatman (London).

Agar noble von Difcó (Detroit).

Heparin (Liquemin 25000, 25000 USP/5ml) von Hoffmann-La Roche.

Der E. coli Stamm, der die 5S RNA-Gene von Xenopus mulleri im Plasmid ColE1-pSC101 trug, war im Labor von Dr.D.D. Brown (Carnegie Institution, Baltimore) hergestellt worden und wurde von Dr. R.G. Roeder zur Verfügung gestellt (Washington University, St. Louis).
Der E.coli Stamm mit dem Plasmid Col E 1-psC 101, das ein

45S RNA Gen aus Xenopus laevis trug, war ein Geschenk von Dr.R. Williamson (St. Mary's Hospital, London).

Alle übrigen Chemikalien wurden in p.a. Qualität von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

Nährmedien und Puffer

L-Broth: 8 g NaCl, 10 g Polypepton, 2 g Glucose, 5 g Hefeextrakt in 1 l Wasser lösen und auf pH 7,4 titrieren

Modifiziertes H-Medium (Kulturmedium):
100 g NH_4Cl, 250 g Caseinhydrolysat, 250 g NaCl, 250 g Glucose, 363 g Tris, 1,8 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 144 ml 87% Glycerin, auf pH 7,4 titrieren, auf 1200 ml auffüllen und autoklavieren. Vor Gebrauch dazu:
2,5 ml 1 M $CaCl_2$, 2,5 ml 1 M $MgSO_4$, 2,5 ml 2,5% Thiamin, 2,5 ml 1% Tetracyclin (alle Lösungen autoklaviert)

1x SET: 0,15 M NaCl, 0,002 M EDTA, 0,01 M Tris-HCl pH 7,5

1x SSC: 0,15 M NaCl, 0,015 M Natriumcitrat, pH 7,2

TSS-Puffer: 0,05 M Tris-HCl pH 7,5, 0,25 M Sucrose, 0,01 M $MgCl_2$, 0,025 M KCl

Polymerasepuffer: 0,05 M Tris-HCl pH 7,9, 0,25 mM EDTA, 5 mM ß-Mercaptoäthanol, 20% Glycerin

Extraktionspuffer: wie Polymerasepuffer mit 1 M Ammoniumsulfat

Resuspensionspuffer I: 1 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 12,5% Glycerin

Resuspensionspuffer II: 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2 mM EDTA, 5 mM DTT, 20 mM $MgCl_2$, 25% Glycerin

G 100-Puffer: 0,1 M Natriumacetat pH 5,5, 0,5% SDS, 4 µg/ml Polyvinylsulfat

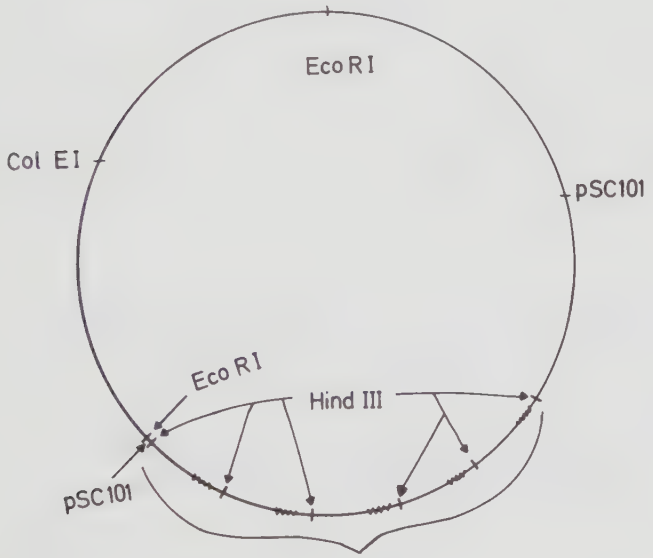
2.2. Methoden

2.2.1. Kultur der Plasmid-DNA-haltigen E. coli Stämme

Verwendet wurden E. coli Stämme, die Plasmide trugen, in die einmal ein Tetramer der 5S RNA Gene und ihrer Spacersequenzen aus Xenopus mulleri oder ein Monomer der 45S DNA aus Xenopus laevis inkorporiert waren. Als Träger der Gene diente das Hybridplasmid Col E 1-pSC 101, bei dem pSC 101 ein Gen für Tetracyclinresistenz trägt und Col E 1 das gesamte Plasmid zur Replikation auch bei fehlender Proteinsynthese, d.h. in Gegenwart von Chloramphenicol befähigt. Von der Agarplattenkultur (1,5% Agar in L-Broth mit 20 µg/ml Tetracyclin) wurde durch Überimpfen von 100 ml L-Broth und Schütteln für 24 Stunden bei 37°C eine Stocklösung angelegt. Die Massenkultur der E. coli Stämme erfolgte an 8 Tagen in je 10 Erlenmeyer-Kolben (2 l) mit je 1200 ml modifiziertem H-Medium (Gussin, 1966) in Gegenwart von Tetracyclin (20 µg/ml), d.h. es wurden insgesamt jeweils etwa 100 l E. coli Kultur verarbeitet. Jeder Ansatz wurde mit 10 ml Stocklösung versetzt und 8 Stunden bei 37°C im Schüttler inkubiert. Dann wurde pro Kolben 250 ug Chloramphenicol zugesetzt und für weitere 12 Stunden geschüttelt. In Gegenwart von Chloramphenicol wird die Replikation der chromosomalen DNA inhibiert; es repliziert nur noch die Col E 1 - pSC 101 Plasmid-DNA, die dadurch angereichert wird. Normalerweise enthält eine E. coli Zelle 20-30 Moleküle Col E 1 - pSC 101. Nach Inkubation in Gegenwart von Chloramphenicol steigt diese Zahl auf 1000-3000 Moleküle pro Zelle (Hershfield et al., 1974), so daß der Anteil der Plasmid-DNA an der Gesamt-DNA ca. 50% beträgt.

Nach Abzentrifugieren der E. coli Suspension für 5 Minuten bei 6500 x g wurden die Zellen von 12 l Kultursuspension in 1200 ml 25% Sucrose, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 suspendiert. Zur Lysis der Zellen wurden im Abstand von 5 Minuten bei 0°C zuerst 40 ml Lysozym (5 mg/ml) und dann 80 ml 0.25 M EDTA pH 8,0 zugegeben (Guerry et al., 1973). Die Lysis der Zellen wurde vervollständigt durch Zufügen von 16 ml 20% SDS. Dieser stark viskosen Suspension wurden langsam und

unter Rühren 84 ml 5 M NaCl zugesetzt. Bei der resultierenden Endkonzentration von 1 M NaCl fiel selektiv die chromosomale DNA aus. Diese konnte nach 20-stündigem Stehen bei 4°C durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 17000 x g abgetrennt werden. Aus dem Supernatant wurde die Plasmid-DNA isoliert.



X. mulleri 5S RNA-Gene

Schematische Darstellung eines Col E 1 - pSC 101 Plasmids, in das fünf 5S RNA "repeating units" integriert sind.
Das Hybridplasmid wurde durch Zusammenfügen der beiden einzelnen Plasmid-DNAs nach Behandlung mit der Restriktionsnuclease Eco R I gebildet. Restriktionsfragmente der 5S RNA-Gene aus Xenopus mulleri wurden durch Inkubation mit Restriktionsnuclease Hind III aus gereinigter chromosomaler 5S RNA-Gene erhalten. Diese oligomeren 5S RNA-Gene wurden in das Hybridplasmid, das ebenfalls mit Hind III behandelt worden war, integriert. Bei Xenopus mulleri beträgt die Länge der Spacersequenzen das 15fache der Genregion (Brown und Sugimoto, 1973). Das Molekulargewicht von pSC 101 und Col E 1 ist 5,8 x 10^6 bzw. 4,2 x 10^6. Bei 4 integrierten 5S RNA-Genen beträgt der Anteil der codierenden Gensequenzen folglich 1,09%.

2.2.2. Isolierung der Plasmid-DNA

250 ml Supernatant wurden mit 250 ml bidestilliertem Wasser verdünnt. Aus dieser Lösung konnte die DNA durch langsame Zugabe von 0,6 Volumen (= 300 ml) Isopropanol ausgefällt und auf einen Glasstab gewickelt werden. Die DNA wurde bei Raumtemperatur in 75 ml 0,2x SET, 0,1% SDS resuspendiert. Zur Deproteinisierung wurde die Suspension dann nach Zufügen von 1 Volumen 80% Phenol eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Die DNA wurde aus der Wasserphase durch Zugabe von 1,2 Volumina 90% Äthanol, 0,1 M Natriumacetat pH 5,5 ausgefällt und nach Lösen in 0,2x SET bei 4°C zum Beladen der Nitrocellulosefilter verwendet. Etwa 40-60% der Absorption dieser Lösung bei 260 nm beruhten auf DNA, der Rest ging auf RNA zurück, die aber nicht an Nitrocellulosefilter bindet und deshalb nicht entfernt zu werden braucht.

2.2.3. Beladen der Nitrocellulosefilter mit Plasmid-DNA

Die DNA-RNA Hybridisierungsexperimente wurden mit Plasmid-DNA durchgeführt, die auf Nitrocellulosefiltern (Schleicher & Schüll, Selectron Filter BA 85) immobilisiert worden war. Dazu wurde die DNA zuerst auf Filter von 14 cm Durchmesser geladen, aus denen dann Filter von 9 mm Durchmesser ausgestanzt wurden. Die eingesetzte Menge DNA wurde so berechnet, daß ein 9 mm Filter etwa 20 µg Plasmid-DNA enthielt (= 0,218 µg 5S RNA Gensequenzen und 2,5 µg 18 und 28S DNA), unter der Voraussetzung daß ca. 80% der DNA binden. Ringförmige DNA, zu der die Plasmid-DNA gehört, existiert als Supercoil, bei dem die DNA-Ringe in sich gedreht sind. Durch Öffnen eines der beiden DNA-Stränge erfolgt eine Umwandlung in die relaxierte Form. Nur in dieser Form bindet die DNA nach Denaturierung an die Nitrocellulosefilter. In Gegenwart von Chloramphenicol replizierte Col E 1 - pSC 101-DNA (d.h. in diesem Fall 98% der gesamten Plasmid-DNA) enthält in einem der beiden DNA-Stränge ein oder mehrere Ribonucleotide, so daß der Supercoil durch Denaturierung mit Alkali, die sowieso nötig ist, da nur einzelsträngige DNA an die

Filter bindet, in die relaxierte Form überführt werden kann (Blair et al., 1972).

Die benötigte Menge DNA wurde mit bidestilliertem Wasser auf 250 ml verdünnt, zur Denaturierung mit 250 ml 1 N NaOH versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann wurden 187 ml 2 x SSC und 250 ml 1 N HCl zugefügt, die Lösung auf pH 7-8 eingestellt und noch 200 ml 4x SSC zugegeben, so daß die Endkonzentration der DNA ca. 4-6 µg/ml in 4x SSC betrug. Diese Lösung wurde auf einen mit 500 ml 4x SSC vorgewaschenen 14 cm-Filter gegeben und sehr langsam filtriert, wobei die denaturierte DNA irreversibel an den Filter band. Der Filter wurde mit 500 ml 4x SSC nachgewaschen, zuerst bei Raumtemperatur und dann 2 Stunden bei 88°C getrocknet. Zur Bestimmung des exakten DNA-Gehalts eines 9 mm-Filters wurden drei Probefilter einzeln einer halbstündigen Behandlung mit 1 N HCl bei 80°C unterworfen, wobei die DNA hydrolysierte und als Absorption in der Lösung meßbar wurde. Die optische Dichte bei 260 nm von 1 mg/ml hydrolysierter DNA in 1 N HCl beträgt 27,8 (Brown und Weber, 1968).

2.2.4. Isolierung der RNA-Polymerasen A, B und C aus HeLa-Zellen, Ascites-Zellen und Rattenleberkernen

a) HeLa-Zellen

Für eine Polymerasepräparation wurde von 10-15 l HeLa-Zellen einer Dichte von 4-5 x 10^5 Zellen/ml ausgegangen. Die Zellen wurden nach Abzentrifugation und Waschen entweder sofort verwendet oder aber nach Einfrieren bei -80°C. Alle Arbeitsgänge wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 2-4°C ausgeführt. Die HeLa-Zellen wurden in 360 ml des stark hypertonen Extraktionspuffers (1 M Ammoniumsulfat) suspendiert, für 30-45 Sekunden ultrabeschallt (Branson Sonfier, 125 W) und anschließend noch eine halbe Stunde gerührt. Diese Behandlung führte zur Disintegration sämtlicher Kernstrukturen (Mikroskop) und zur Freisetzung der an das Chromatin gebundenen Polymerasemoleküle. Außerdem wurde dabei das Molekulargewicht der DNA erniedrigt, die damit besser in Lösung

ging. Dann wurden die Proteine langsam mit Ammoniumsulfat (3,3 g/10 ml) gefällt. Die DNA blieb hierbei auf Grund ihrer stark polaren sekundären Phosphatgruppen in Lösung und ließ sich von den Proteinen abtrennen. Nach Zentrifugation für 1 1/2 Stunden bei 90 000 x g in der Ultrazentrifuge wurden die Proteinsedimente in ca. 100 ml Polymerasepuffer suspendiert und bei ein- bis zweimaligem Wechsel des Puffers so lange gegen Polymerasepuffer dialysiert, bis die Ionenstärke auf 50 mM Ammoniumsulfat gesunken war (6-8 Stunden). Ein Teil der Proteine fiel dabei durch Aggregatbildung mit anderen Proteinen flockig aus und wurde durch Zentrifugation (4 000 x g, 15 Minuten) abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine mit Polymerasepuffer äquilibrierte DEAE-Cellulose DE 32-Säule (4,5 cm x 22 cm) aufgetragen, so lange nachgewaschen, bis die nicht bindenden Proteine ausgewaschen waren (100-150 ml) und mit einem linearen Ammoniumchloridgradienten (0-0,4 M) eluiert. Das Gesamtvolumen des Gradienten betrug 1200 ml (= 3,4faches Säulenvolumen), die Fraktionsgröße 12-15 ml und die Laufzeit des Gradienten 15-18 Stunden. Nach Titration der Fraktionen mit $AgNO_3$ zur Bestimmung des Verlaufs des Chloridgradienten wurden aus jeder Fraktion 110 µl entnommen für den Test auf Polymeraseaktivität.

Der Test beruhte auf der Messung des Einbaus von ^{3}H-UTP als ^{3}H-UMP durch RNA-Polymerase in säurefällbare RNA und wurde in einem Gesamtvolumen von 150 µl unter folgenden Bedingungen durchgeführt:
je 1 mM ATP, CTP, GTP; 0,1 mM UTP, 1 µCi ^{3}H-UTP (10-20 Ci/mmol) 20 µg native Kalbsthymus-DNA,
3,3 mM $MnSO_4$,
10 mM ß-Mercatoäthanol,
110 µl Fraktionslösung.
Inkubationstemperatur: 37°C, Inkubationszeit: 30-60 Minuten
Nach der Inkubation wurden 120 µl Aliquots wie unter "RNA Synthese" beschrieben für die Radioaktivitätsmessung verwendet.

Von der DEAE-Cellulose-Säule eluierten die RNA-Polymerasen A und C zusammen bei einer Ionenstärke von 0,18-0,2 M Ammo-

niumchlorid und die Polymerase bei ca. 0,3 M. Zur weiteren Auftrennung und Reinigung wurden die Fraktionen, die Polymeraseaktivität A und C bzw. B aufwiesen, getrennt gepoolt, wie vorher dialysiert (3-4 Stunden) und anschließend getrennt auf zwei DEAE-Sephadex A 25-Säulen (14 cm x 2,5 cm) aufgetragen, die zwei Tage lang mit Polymerasepuffer mit 50 mM $(NH_4)_2SO_4$ äquilibriert worden waren. Eluiert wurde ohne Nachwaschen der Säulen mit einem linearen Gradienten von 0,05-0,45 M Ammoniumsulfat (Gesamtvolumen: 250 ml = 3,5faches Säulenvolumen). Auf DEAE-Sephadex-Säulen zeigen die Polymerasen A und C ein stark unterschiedliches Elutionsverhalten und lassen sich deshalb gut voneinander trennen. Das Enzym A eluierte bei 0,12 M Ammoniumsulfat und Enzym C bei ca. 0,3 M. Gelegentlich erreicht man im Ammoniumsulfatgradienten auch eine Auftrennung des Enzyms C in seine beiden Unterformen C_1 und C_2, die sich nur wenig im Elutionspunkt unterscheiden (C_1: 0,32 M, C_2: 0,36 M). Das Enzym B eluierte auf der zweiten Sephadex-Säule bei 0,25 M. Die Laufzeit des Gradienten betrug 12-15 Stunden und die Fraktionsgröße ca. 3 ml. Die Lage des Sulfatgradienten wurde durch Messung der Leitfähigkeit (WTW-Meßgerät, Modell LF 39) und Vergleich mit einer Eichkurve bestimmt. Der Aktivitätstest wurde wie vorher ausgeführt. Fraktionen, die Polymeraseaktivität A, B oder C (ggf. C_1 und C_2) zeigten, wurden getrennt gepoolt und die Proteine sehr langsam mit Ammoniumsulfat (3,5 g/10 ml) gefällt und für 30 Minuten bei 24 500 x g im Swing-Rotor abzentrifugiert. Die Proteinsedimente wurden nach gründlichem Abtropfen und Auswischen der Tubes in 0,5-1 ml einer Mischung von Resuspensionspuffer I und II (1+1) gelöst und in flüssigem Stickstoff oder bei -80°C in 50-100 µl Aliquots eingefroren. In den ersten Experimenten mit exogenen Polymerasen wurde ein Enzym C verwendet, das nur durch DEAE-Cellulose gereinigt worden war. In diesen Fällen wurden die Proteine der Polymerase A und C-haltigen Fraktionen mit Ammoniumsulfat gefällt, die Sedimente in ca. 1 ml des Resuspensionspuffergemischs aufgenommen und gegen den gleichen Puffer dialysiert, um das

Ammoniumsulfat zu entfernen, und eingefroren. Das von DEAE-Sephadex eluierende Enzym C wurde durch diese Behandlung inaktiviert und deswegen wie oben beschrieben behandelt.

b) Ascites-Zellen

Es wurde analog zur für HeLa-Zellen beschriebenen Methode vorgegangen. Als Ausgangsvolumen wurden 7 l Ascites-Zellen einer Dichte von 8,4 x 10^5 Zellen/ml gewählt.

c) Rattenleberkerne

10 Ratten (Wistar II) wurden durch cervikale Dislokation getötet, die freigelegten Lebern mit eiskaltem TSS-Puffer im Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert und für 10 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Die lockeren Kernsedimente, die neben Zellkernen noch Membranfragmente und andere Zellbestandteile enthielten, wurden zur weiteren Reinigung der Zellkerne (Chauveau et al., 1956) in hypertoner 2,2 M Sucrose (in TSS) aufgenommen und für zwei Stunden bei 90 000 x g im SW 27 Rotor über einem Kissen von 6 ml der gleichen Sucroselösung zentrifugiert. Die Zellkerne bildeten ein weißliches Pellet und wurden nach Suspension in 360 ml Extraktionspuffer wie bei HeLa-Zellen beschrieben weiterbehandelt.

2.2.5. Prüfung der RNA-Polymerasen auf Aktivität, Reinheit und Nucleasen

Da die RNA-Polymerasen den Chromatinansätzen zur RNA-Synthese zugefügt werden sollten, mußte ihre Aktivität nach der Reinigung und dem Einfrieren noch einmal unter den später verwendeten Bedingungen bestimmt werden. Für jedes Enzym wurde die Aktivität bei 0, 0,5 und 200 µg/ml α-Amanitin ermittelt, was gleichzeitig erlaubte, eine Aussage über die Identität und die Verunreinigungen durch andere Polymerasen zu machen. Das Testvolumen betrug 40 µl. Abweichend von den bei "RNA-Synthese" beschriebenen Bedingungen enthielt die Inkubationslösung 2 ug native Kalbsthymus-DNA, 4-6 µCi ^{3}H-UTP (14-20 Ci/mmol) und 0,1 mM UTP. Es wurde so viel Enzymlösung

eingesetzt, daß die Ammoniumsulfatkonzentration 25 mM betrug. Dazu wurde vorher die Ammoniumsulfatkonzentration der Enzymlösungen durch Messung der Leitfähigkeit und Vergleich mit einer Eichkurve bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten bei 25°C. Nach der Inkubation wurde die gesamte Lösung auf Papierfilter pipettiert und mit TCA wie bei "RNA-Synthese" genauer beschrieben weiter behandelt. An Hand der spezifischen Aktivität des ^{3}H-UTP im Ansatz wurde berechnet, wie viele pmol ^{3}H-UMP die Enzyme in RNA inkorporierten. Als eine Einheit Polymeraseaktivität wurde die Menge Enzym bezeichnet, die in 20 Minuten unter obigen Bedingungen 1 pmol ^{3}H-UMP in RNA einbaute.

Zusätzlich wurden die Enzymlösungen auf RNase-Aktivität geprüft. Dazu wurden unter den eben beschriebenen Bedingungen 1-2 x 10^{5} cpm ^{3}H-rRNA (in H_2O) bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Die Ansätze enthielten 10 µl Enzymlösung bzw. 10 µl des Gemischs der beiden Resuspensionspuffer. Alle Enzyme erwiesen sich als frei von RNase.

2.2.6. Präparation von HeLa-Kernen und HeLa-Chromatin

Für alle Versuche wurden die in Eagle's minimum essential Medium in Suspension wachsenden HeLa S_3 Zellen verwendet. Für eine Kernpräparation wurden 300 ml Zellen mit einer Dichte von 3-6 x 10^{5} Zellen/ml 7 Minuten bei 2000 x g abzentrifugiert, mit 50 ml 0.03 M Tris-HCl pH 7,4, 0,15 M NaCl gewaschen, in 12 ml 0,3 M Sucrose, 2 mM $MgCl_2$, 3 mM $CaCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM DTT, 0,1% Triton X 100 aufgenommen und 16 x mit einem Glas-Douncer homogenisiert, um die Zellen zu lysieren. Die Kernsuspension wurde mit 12 ml 2,0 M Sucrose, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM DTT gemischt und zur Sedimentation der Kerne 50 Minuten über einem Kissen von 2,5 ml 2,0 M Sucrose-Puffer bei 25 000 x g in 15 ml Corex-Tubes zentrifugiert. Dabei wurden die Zellfragmente an der Grenzfläche der beiden Sucroselösungen zurückgehalten.

In den Fällen, wo die Kerne direkt zur RNA-Synthese eingesetzt werden sollten, wurden die Kernsedimente in einem Puffer suspendiert, der 10 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 0,2 mM EDTA, 25% Glycerin, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 enthielt und sofort verwendet. Das Volumen des Puffers wurde so gewählt, daß die Konzentration der Kerne 2 x 10^8/ml betrug, ohne Berücksichtigung der Tatsache, daß die Kernausbeute nur etwa 70% betrug.

Für die Chromatinpräparation wurde im wesentlichen nach einer Methode von Reeder (1973) verfahren, die eine Lysis der Kerne im stark hypotonen Medium darstellt. Dazu wurden die Kernsedimente in 2-3 ml Resuspensionspuffer I, der 1 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 12,5% Glycerin enthielt, 50-60 x im Glas-Douncer homogenisiert, bis das mikroskopische Bild zeigte, daß alle Kerne wenigstens teilweise lysiert waren. Das Chromatin wurde durch Zentrifugation bei 16 000 x g als gelatinöses Pellet gewonnen und je nach der Ausgangsdichte der Zellen in 0,4-0,8 ml Resuspensionspuffer I kurz homogenisiert. Dann wurde ein gleiches Volumen von Resuspensionspuffer II (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2 mM EDTA, 5 mM DTT, 20 mM $MgCl_2$, 25% Glycerin) zugegeben und nochmals kurz homogenisiert. Diese Suspension wurde sofort als Chromatin zur RNA-Synthese verwendet. Bis hierher wurden alle Arbeitsschritte bei 0^oC ausgeführt.

Der Proteingehalt des Chromatins wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Zur Bestimmung des DNA-Gehalts wurde nach Extraktion des Chromatins mit Perchlorsäure die Methode von Burton (1956) herangezogen.

Es konnte festgestellt werden, daß bei der Chromatinpräparation keine DNA in den abgetrennten Supernatant überging, so daß man auf Grund der Ausgangsdichte der Zellsuspension, der Ausbeuteberechnung bei der Kernpräparation und dem Endvolumen der Chromatinsuspension auch für die Chromatinexperimente angeben konnte, wie viele Kernäquivalente in den Ansätzen zugegen waren.

2.2.7. RNA-Synthese in isolierten HeLa-Kernen und Chromatin

Die gesamte RNA-Synthese wurde verfolgt durch Messung des Einbaus von ^{3}H-UTP in säurefällbare RNA, während der Anteil von in vitro synthetisierter 5S RNA bzw. 18S und 28S RNA durch Hybridisierung an die entsprechenden DNAs berechnet wurde. Die Synthesereaktion wurde bei 25°C ausgeführt in einem Gesamtvolumen von 30 µl für Kernansätze, 60 µl für Ansätze mit Chromatin und 120 µl für alle Ansätze, denen exogene eukaryonte Polymerasen zugesetzt wurden. Sofern bei den einzelnen Versuchen nicht anders angegeben, enthielt das Reaktionsgemisch:

je 1 mM ATP, CTP und GTP
0,05 mM UTP (unmarkiertes und ^{3}H-UTP zusammen)
20 µCi/60 µl oder 40 µCi/120 µl Ansatz ^{3}H-UTP (4 Ci/ml H_2O, 10-20 Ci/mmol)
0,5 µg/ml α-Amanitin, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 1,5 mM DTT, 5 mM $MgCl_2$, 0,075 mM EDTA
in Kernansätzen: 12,5% Glycerin, 50 mM Ammoniumchlorid, 15 µl Kernsuspension (= 2,1 x 10^6 Kerne)
in Chromatinansätzen: 9,3% Glycerin, 25 mM Ammoniumsulfat, 30 µl Chromatinsuspension

Als exogene RNA-Polymerasen wurden den Chromatinansätzen zugefügt:

1.) E. coli RNA-Polymerase in Burgess-Puffer (100 E/35 µl)
2.) RNA-Polymerasen A, B und C (C_1 und C_2) aus HeLa-Zellen
3.) RNA-Polymerasen A, B und C aus Rattenleberkernen
4.) RNA-Polymerase A und C aus Ehrlich-Ascites-Zellen

Das maximal einsetzbare Volumen der exogenen eukaryonten Polymerasen war abhängig von ihrer Ammoniumsulfatkonzentration (100-300 mM), da die Konzentration im Inkubationsansatz 25 mM nicht überschreiten durfte. Zur Berechnung der Hybridisierungseffizienz wurden parallel zu einzelnen Ansätzen sogenannte Mock-Ansätze ausgeführt, die nur unmarkiertes UTP enthielten, denen aber nach Beendigung der Inkubation 1000-3000 cpm von in vivo synthetisierter ^{3}H- oder ^{32}P-5S RNA zugesetzt wurde.

Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit, d.h. wenn

nicht anders vermerkt, nach 20 Minuten, wurde den Ansätzen DNase I-Lösung (RNase-frei) zugefügt und noch 10 Minuten bei $0^{o}C$ weiterinkubiert. Die DNase-Konzentration betrug in 140 µl Endvolumen 60 µg/ml in 3-4,3 mM $MgCl_2$. Durch Zugabe von 2,5 µl E. coli tRNA (10 mg/ml) als Carrier, 7,5 µl ^{3}H-5S RNA (für Mock-Ansätze) bzw. Wasser (für ^{3}H-Ansätze) und 150 µl 1% SDS wurde die Inkubation beendet.
Bei allen denjenigen Ansätzen, die zur Größenanalyse der in vitro synthetisierten RNA bestimmt waren, entfiel die Inkubation mit DNase.
Die ^{3}H-RNA wurde gereinigt durch Extraktion bei $65^{o}C$ mit 1 Volumen (= 300 µl) 80%igem Phenol (5 x 30 Sekunden) und danach mit 1 Volumen Chloroform bei Raumtemperatur (2 x 30 Sekunden). Die Wasserphase wurde 3 x mit 2 Volumina 90% Äthanol, 0,1 M Natriumacetat pH 5,5 bei $-20^{o}C$ gefällt (4-7 Stunden), jeweils 10 Minuten bei 25 000 x g abzentrifugiert und in 0,5% SDS aufgenommen, zuletzt in 125 µl. Diese RNA-Lösungen wurden für Hybridisierungsexperimente und Größenanalysen durch Sephadex G-100 Gelchromatographie und Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet.

Radioaktivitätsmessung

Von allen Ansätzen wurden Aliquots entnommen, um erstens die Gesamtsynthese an RNA und zweitens die zur Hybridisierung eingesetzte Menge an ^{3}H-RNA (Input) zu bestimmen.
Dazu wurden je 20 µl RNA-Lösung nach der letzten Äthanolfällung auf Papierfilter (Durchmesser 2,5 cm, Schleicher & Schüll, 2034 b) pipettiert, diese etwa eine Stunde in eiskalter 5%iger TCA gewaschen (5maliger Wechsel der TCA), dann in Methanol, Methanol/Aceton (1+1) und Äther, getrocknet und die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationssystem gemessen (5 g PPO, 200 mg POPOP in 1 l Toluol. Die Zählausbeute für ^{3}H-RNA auf Filtern lag zwischen 20% und 30% bei den einzelnen Countern. Die in den Ergebnissen angegebenen spezifischen Aktivitäten bei den einzelnen Versuchen sind bereits auf 100% Zählausbeute umgerechnet worden. Für die ^{32}P-RNA lag die Zählausbeute bei 100%.

2.2.8. DNA-RNA-Hybridisierung der in vitro synthetisierten RNA

Der Anteil der in vitro synthetisierten 5S RNA ist im Vergleich zur Menge der endogen in isolierten HeLa-Kernen vorhandenen 5S RNA in den Hybridisierungsansätzen sehr niedrig. Um möglichst vollständig die in vitro synthetisierte 5S RNA zu erfassen, ist eine Hybridisierung im 5S DNA Überschuß unabdingbar. Da 2 x 10^6 HeLa-Kerne, die in einem normalen Syntheseansatz enthalten waren, ca. 0,16 µg endogene 5S RNA enthielten, mußten für jeden Hybridisierungsansatz ca. 40 µg Plasmid DNA eingesetzt werden. Das entsprach 0,436 µg der codierenden 5S DNA Sequenzen und einem 2-3fachen Überschuß. Die Hybridisierungen wurden in einem Gesamtvolumen von 250 µl in 4 x SSC, 0,2% SDS für 7-12 Stunden bei 67°C durchgeführt. Die Ansätze enthielten je 100 µl der insgesamt 125 ul der ^{3}H-RNA Probenlösung, je 2 DNA-Filter (5S DNA und in einem Fall 45S DNA in Plasmid-DNA) und einen Blankofilter, der nur mit 4 x SSC gewaschen worden war.
Zur Hybridisierung der Sephadex G 100 Fraktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 1,25 ml je 500 µl Aliquots der Fraktionen eingesetzt. Hier waren 1 DNA- und 1 Blankofilter ausreichend. Analog wurde bei der Hybridisierung der Polyacrylamidgelfraktionen verfahren.
Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Proben abgekühlt, 4 x 10 Minuten mit 2x SSC gewaschen, 1 Stunde bei Raumtemperatur mit RNase A (20 µg/ml) und RNase T_1 (0,2 µg/ml) in 2x SSC inkubiert, nochmals wie vorher gewaschen, getrocknet und die Radioaktivität der Filter bestimmt. Von der Radioaktivität der DNA-Filter wurden die Blankowerte (10-30 cpm) subtrahiert.

Prähybridisierung

Die Hybridisierung der Filter erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie oben. Als RNA wurde unmarkierte 5S RNA aus Rattenleber verwendet. Pro DNA-Filter wurden 40 µg 5S RNA (= 100facher Überschuß) eingesetzt; die Blankofilter wurden mit 10 µg/Filter vorhybridisiert. Nach der Hybridisierung

wurden die Filter lediglich gründlich mit 2x SSC gewaschen und anschließend für die Hybridisierungen mit ^{3}H-in vitro RNA benutzt.

2.2.9. Gelfiltration der in vitro synthetisierten RNA auf Sephadex G 100

Die ^{3}H-RNA wurde nach der letzten Äthanolfällung in 500 µl 0,1 M Natriumacetat pH 5,5, 0,5% SDS, 4 µg/ml Polyvinylsulfat (G 100-Puffer) aufgenommen. 20 µl Aliquots wurden für die Bestimmung der gesamten aufgetragenen Radioaktivität auf Papierfilter pipettiert und mit TCA gewaschen, 480 µl wurden auf einen Sephadex G 100 Säule (60 cm x 1,5 cm) aufgetragen und mit obigem Puffer eluiert. Die Elution der Säule erfolgte mit 40 cm hydrostatischem Druck, Fraktionen von 1,65 ml wurden gesammelt. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 10 ml/h. 100 µl Aliquots der Fraktionen wurden zur Messung des Radioaktivitätsprofils entnommen, weitere 500 µl wurden gegen 5S DNA hybridisiert.

2.2.10. Elektrophorese der in vitro synthetisierten RNA auf formamidhaltigen Polyacrylamidgelen

Die Elektrophorese in 12%igen Polyacrylamidgelen in Formamid wurde nach der Methode von Pinder et al. (1974) durchgeführt. Dabei wurde die Form der Plattengele gewählt, die eine vergleichende Analyse mehrerer Proben gleichzeitig erlaubt. Bei der verwendeten Polyacrylamidkonzentration von 12% ist das Auflösungsvermögen der Gele im niedermolekularen Bereich (4S-5S) besonders gut. Das Formamid wurde vor Gebrauch eine Stunde mit Amberlite MB I (1 g Amberlite/50 g Formamid) gerührt. Für die Herstellung der Plattengele wurde folgendermaßen vorgegangen:
3,6 g Acrylamid, 7,5 ml Äthylendiacrylat (0,5 ml/30 ml), 72 µl TEMED, 0,11 µl Diäthylbarbiturat wurden in Formamid gelöst, auf pH 9 titriert und mit Formamid auf 30 ml aufgefüllt. Dann wurden 0,24 ml einer 18%igen Ammoniumpersulfatlösung zugefügt. Diese Lösung wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, die von Klemmen zusammengehalten wurden,

an den beiden Seiten und unten mit 1,3 mm breiten Plastikstreifen voneinander getrennt und mit 2%iger polymerisierter Agarose abgedichtet worden waren. Durch Einschieben eines Plastikkammes an der oberen vierten Seite entstanden nach Polymerisation des Gels Taschen, in die die zu analysierende RNA-Lösung aufgetragen werden konnte. Dazu wurde die RNA nach der letzten Äthanolfällung in 40 µl Formamid aufgenommen, mit 15 µl 2,3 M Sucrose und Bromphenolblau als Marker versetzt. 50 µl dieser Lösung wurden jeweils in die Taschen aufgetragen. Gleichzeitig wurden ^{32}P-markierte 5S und tRNA als Größenmarker mit aufgetragen. Die Dauer der Elektrophorese betrug 9-10 Stunden mit 10 mA/200 V Gleichstrom. Als Elektrolysepuffer wurde 0,1 M NaCl verwendet. Jedes Plattengel wurde nach Beendigung der Elektrophorese in 2 mm breite Streifen geschnitten (ca. 50 Fraktionen/Gel), in 600 µl 4x SSC, 0,2% SDS über Nacht bei 68°C inkubiert, um das Gel zu lösen und die RNA freizusetzen. 100 µl Aliquots wurden dann entnommen zur Bestimmung der gesamten Radioaktivität in den Fraktionen und mit TCA gefällt. 500 µl wurden wie schon beschrieben hybridisiert.

2.2.11. Oligonucleotidanalyse der in vitro synthetisierten 5S RNA nach Verdauung mit RNase T_1

Die ^{3}H-RNA wurde wie schon beschrieben auf einer Sephadex G 100 Säule fraktioniert und die gesamte 5S Region an DNA-Filter hybridisiert. Die 5S RNA wurde von den getrockneten Filtern wiedergewonnen durch Erhitzen auf 96°C für 5 Minuten in 0,1x SSC (Ausbeute 90%) und mit 200 µg E. coli tRNA als Carrier und in vivo ^{32}P-18S und 28S RNA aus HeLa-Zellen als Marker versetzt und äthanolgefällt. Die RNA wurde dann in 500 µl Gesamtvolumen (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 mM EDTA) mit 500 Einheiten RNase T_1 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Lösung mit 20 mM Tris-HCl pH 7,9, 7 M Harnstoff zehnfach verdünnt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (0,6 cm x 23 cm) aufgetragen, die mit dem gleichen Puffer äquilibriert worden war (Suzuki und Brown, 1972). Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0,66-0,4 M NaCl (je 150 ml). Es

wurden Fraktionen zu ca. 3 ml gesammelt. Die Laufgeschwindigkeit betrug 30 ml/Stunde. Von 0,5 ml Aliquots der Fraktionen wurde die Radioaktivität bestimmt in einem Szintillationsgemisch aus 10 ml der PPO- und POPOP haltigen Toluollösung und 6 ml Methylglykol.

2.2.12. Präparation von in vivo ^{3}H- oder ^{32}P-markierter rRNA, 5S RNA und tRNA aus HeLa-Zellen

300 ml HeLa-Zellsuspension einer Dichte von 1,0-1,5 x 10^5 Zellen/ml wurden mit 3 mCi ^{3}H-Uridin (5 Ci/mmol) oder mit 20 mCi ^{32}P-Orthophosphat versetzt und mit 120 rpm für 48 Stunden in einem New Brunswick Shaker bei 37°C geschüttelt. Nach Abzentrifugieren und Waschen wurden die Zellen in 12 ml 0,3 M Sucrose, 2 mM $MgCl_2$, 3 mM $CaCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1% Triton X 100 durch Pottern lysiert. Die Zellkerne konnten durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 4000 x g im HB 4 Rotor abgetrennt werden. Der zytoplasmatische Überstand wurde auf eine Konzentration von 1% SDS gebracht, mit 1 Volumen 80% Phenol 5 x 1 Minute bei 65°C extrahiert und dann mit 1 Volumen Chloroform. Die resultierende Wasserphase wurde äthanolgefällt, die RNA in 500 µl des G 100-Puffers aufgenommen und wie schon beschrieben auf einer Sephadex G 100 Säule chromatographiert. Die 5S RNA und tRNA enthaltenden Fraktionen wurden getrennt gepoolt, äthanolgefällt, nochmals auf der gleichen Säule chromatographiert und wieder gefällt. Die RNAs wurden in 200 µl 0,5% SDS aufgenommen.
Um die ribosomalen RNA-Spezies zu isolieren, wurde die hochmolekulare RNA, die von der ersten G 100-Säule im Ausschlußvolumen eluierte, gefällt und durch Sucrosegradienten-Zentrifugation für 15 Stunden bei 70 000 x g aufgetrennt. Der Gradientenpuffer enthielt 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,1% SDS und 10-30% Sucrose. 18S und 28S RNA wurden getrennt gefällt und bei Bedarf im Verhältnis ihrer Molekulargewichte gemischt. Diese RNAs wurden verwendet in den Mock-Ansätzen zur Berechnung der Hybridisierungseffizienz und als Marker bei der Größenanalyse der in vitro RNA.

2.2.13. Präparation von 5S RNA aus Rattenleberribosomen

Aus 10 kleinen Ratten (Wistar II) wurden nach 24-stündigem Hungern die Lebern präpariert (s. Polymerasepräparation) und in 0,35 M Sucrose, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,4 homogenisiert. Auf eine erste Zentrifugation des Homogenats für 10 Minuten bei 1000 x g zur groben Abtrennung der Kerne folgten dann noch zwei weitere Zentrifugationen jeweils des Supernatants, und zwar zuerst für 30 Minuten bei 23 500 x g, wobei die Kerne sedimentierten, und dann für 2 Stunden im SW 27 Rotor bei 90 000 x g. Bei dieser letzten Zentrifugation pelletieren die Ribosomen, die in 100 ml des obigen Puffers, der zusätzlich 1% SDS enthielt, suspendiert wurden. Die Ribosomensuspension wurde nach Zusatz von 100 ml 80% Phenol 75 Minuten bei Raumtemperatur extrahiert und anschließend zur Phasentrennung 20 Minuten bei 4000 x g zentrifugiert. Die vereinigten Wasserphasen wurden über Nacht bei -20°C äthanolgefällt und die RNA durch Zentrifugation gewonnen. Die RNA-Pellets wurden in 100 ml 0,3 M Natriumacetat pH 5,5 gelöst und mit 50 ml (=0,5 Vol.) Isopropanol 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Unter diesen Bedingungen wurde bei der darauffolgenden Zentrifugation selektiv die hochmolekulare RNA abgetrennt. Durch weitere Zugabe von 60 ml Isopropanol (= insgesamt 1,1 Vol.) zu der Lösung und Stehenlassen bei 4°C über Nacht wurde dann die niedermolekulare RNA (5S RNA und tRNA) ausgefällt. Die Pellets wurden in 400 ul des G-100-Puffers aufgenommen und wie beschrieben auf einer G 100-Säule chromatographiert. Die Fraktionen, die 5S RNA enthielten, wurden gepoolt, äthanolgefällt und in 200 µl 0,5% SDS aufgenommen. Diese RNA wurde bei den Prähybridisierungsexperimenten eingesetzt.

2.2.14. Präparation von hochmolekularer DNA aus HeLa-Zellkernen

Zur Isolierung der DNA wurde im wesentlichen nach einer Methode von Gross-Bellard et al. (1973) verfahren, mit der

DNA mit Molekulargewichten von 40-500 x 10^6 ohne Einzelstrangbrüche erhalten werden kann. Soweit möglich wurden sterilisierte Lösungen, Dialyseschläuche und Gefäße verwendet.

1000 ml HeLa-Zellsuspension (3,6 x 10^5 Zellen/ml) wurden abzentrifugiert, gewaschen und sofort in 500 ml Puffer A (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5% SDS) lysiert, der zusätzlich 50 µg/ml Proteinase K enthielt. Das sehr viskose Lysat wurde in einer 3 L-Rollflasche für 18 Stunden bei 37°C inkubiert, wobei es von Zeit zu Zeit ganz vorsichtig geschwenkt wurde. Durch diese Behandlung wurde erstens die Wirkung degradierender Enzyme fast vollkommen ausgeschlossen und zweitens die DNA auf sehr schonende Weise deproteinisiert, da Proteinase K durch SDS stark aktiviert wird.

Anschließend wurde ein gleiches Volumen von mit Puffer B (wie Puffer A, aber mit 500 mM Tris-HCl pH 8,0) gesättigtem Phenol zugegeben und die Flasche 20 Minuten horizontal mit 40 rpm bei Raumtemperatur gerollt. Nach Abkühlen auf 7°C und Zentrifugation für 10 Minuten bei 500 x g wurde die Wasserphase nach Abgießen bzw. Abpipettieren durch die obere weite Öffnung einer 10 ml-Pipette ein zweites Mal wie vorher extrahiert.

Die folgende Dialyse der hochviskosen Wasserphase wurde in Schläuchen durchgeführt, die vorher 10 Minuten mit 64%iger $ZnCl_2$-Lösung behandelt worden waren, um die Porengröße zu erhöhen, wodurch Oligonucleotide bis zu einem Gewicht von 3-4 x 10^3 permeieren können (Craig, 1967). Es wurde so lange bei Raumtemperatur gegen Puffer C (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl) dialysiert, bis die Absorption bei 270 nm außerhalb des Dialyseschlauchs kleiner als 0,05 war. Die Lösung wurde darauf in einen unbehandelten Schlauch umgefüllt und bei 80°C vorinkubierte RNase A (50 µg/ml) und RNase T_1 (2µg/ml) wurden zugefügt. Die Dialyse wurde dann noch 4 Stunden gegen Puffer C bei 37°C fortgesetzt. Nach Zugabe von SDS (Endkonzentration 0,5%) und Proteinase K (50 µg/ml) wurde die Lösung für weitere 12 Stunden bei 37°C

inkubiert und darauf wie schon beschrieben zweimal phenol-extrahiert. Es folgte eine letzte Dialyse der Wasserphase, wieder in einem mit $ZnCl_2$ behandelten Schlauch gegen Puffer D (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA, 10 mM NaCl) zuerst für eine Stunde bei Raumtemperatur, dann bei $4^{o}C$ so lange, bis keinerlei UV-Absorption im Dialysepuffer mehr zu messen war (2-3 Tage). Die so isolierte HeLa-DNA zeigt im neutralen Sucrose-Gradienten ein Molekulargewicht von 40-80 x 10^6.

3. Ergebnisse

3.1. Transkription von ribosomaler 5S RNA in isolierten HeLa-Zellkernen

Studien zur Transkription spezifischer RNA-Spezies in vitro benötigen ein System, das RNA über einen längeren Zeitraum synthetisiert. Isolierte Kerne stellen ein solches System dar; es enthält außerdem das als Matrize dienende Chromatin in weitgehend intakter Form. Da isolierte Kerne permeabel für niedermolekulare Substanzen sind, können die in vitro Versuche unter definierten Bedingungen mit Inhibitoren, die von intakten Zellen nicht aufgenommen werden, durchgeführt werden.

3.1.1. Optimierung der Synthesebedingungen

Als erstes war es nötig, die Bedingungen für die in vitro Synthese der 5S RNA zu optimieren. Diese Untersuchungen waren Gegenstand einer systematischen Analyse (Yamamoto und Seifart, 1977), die der Vollständigkeit halber hier kurz wiederholt wird, da sie die Voraussetzung für die Untersuchungen am Chromatin darstellt. Die Optimierung der Synthesebedingungen wurde erst dadurch möglich, daß seit kurzem die gereinigten 5S DNAs aus Xenopus laevis und Xenopus mulleri-Oocyten durch Einbau in bakterielle Plasmid-DNA in ausreichender Menge erhalten werden können, so daß man die in vitro synthetisierte 5S RNA durch DNA-RNA-Hybridisierung quantitativ und spezifisch erfassen kann.
Frühere Untersuchungen zur Synthese niedermolekularer RNA-Spezies in vitro (Price und Penman, 1972b; Marzuluff et al., 1974; Udvardy und Seifart, 1976; Weil und Blatti, 1976; Sarma et al., 1976) basierten lediglich auf einer Optimierung der Gesamt-RNA-Synthese, die jedoch nicht notwendigerweise mit der Synthese einer bestimmten RNA-Spezies korreliert sein muß.
Die zu optimierenden Parameter waren: Mg^{2+} bzw. Mn^{2+}-Kon-

zentration, Salzkonzentration (Ionenstärke), UTP-, Glycerin- und α-Amanitin-Konzentration sowie die Inkubationstemperatur. Die HeLa-Kerne wurden wie unter "Methoden" beschrieben inkubiert, wobei jeweils der zu untersuchende Parameter variiert wurde. Bis auf die Versuche zur Optimierung der α-Amanitin-Konzentration wurden alle Ansätze in Gegenwart von 0,5 µg/ml α-Amanitin inkubiert, so daß nur noch die Polymerase A und C aktiv waren. Die RNA wurde extrahiert und zur Bestimmung der Gesamt-RNA-Synthese und zur Hybridisierung gegen 5S DNA eingesetzt. Als optimal ergaben sich folgende Bedingungen:

1.) 5 mM Mg^{2+}

Mg^{2+} war Mn^{2+} als divalentes Kation vorzuziehen, da letzteres unspezifische Initiation der Polymerasen begünstigte und selbst in niedrigen Konzentrationen die 5S RNA-Synthese senkte.

2.) 50 mM Ammoniumchlorid

Die 5S RNA-Synthese war im Gegensatz zur Synthese von rRNA gegenüber höheren Ionenstärken sehr empfindlich. Ihr Optimum lag deutlich niedriger als das für die rRNA-Synthese.

3.) 12,5% Glycerin

Diese Konzentration hatte keinen negativen Effekt auf die 5S RNA-Synthese und stabilisierte gleichzeitig die RNA-Polymerasen.

4.) UTP: 0,05-0,10 mM

UTP sollte als radioaktiver Vorläufer eingesetzt werden, so daß darauf geachtet werden mußte, nicht durch unnötig hohe UTP-Konzentrationen die spezifische Radioaktivität im Ansatz zu erniedrigen. Im Bereich von 0,02 bis 1,63 mM blieb die gesamte RNA-Synthese und der Anteil der 5S RNA an der gesamten in vitro synthetisierten RNA konstant.

5.) Temperatur: 25°C

Bei dieser Temperatur war eine sehr gute Linearität der RNA-Synthese bis zu einer Inkubationszeit von 40 Minuten gegeben.

6.) α-Amanitin: 0,5 µg/ml

Bei dieser Konzentration wurde die Polymerase B inaktiviert, d.h. in allen Ansätzen wurde nur noch die Aktivität von Polymerase A und C gemessen.

3.1.2. Quantitierung der 5S RNA-Synthese in isolierten HeLa-Kernen

Unter den optimierten Bedingungen wurde das Ausmaß der 5S RNA Synthese durch die endogene Polymerase C untersucht. Tab. 1 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuchs.

Tab. 1: Quantitierung der 5S RNA-Synthese in isolierten HeLa-Kernen

Zeit (min)	eingesetzte Radioaktiv. (cpm)		hybridisierte Radioaktivität (cpm)		Hybrid. eff. %	^{3}H-5SRNA (pmol)	Moleküle 5SRNA/ Kern	% 5SRNA
	^{3}H	^{32}P	^{3}H	^{32}P				
20	10577	1048	690	231	22	0,035	10500	30,1
40	14754	1012	1217	232	23	0,059	17700	36,0

Abweichend von den unter "RNA-Synthese" beschriebenen Bedingungen enthielt der Syntheseansatz 12 µCi ^{3}H-UTP. Die Inkubation wurde bei 25°C ausgeführt und die RNA wie beschrieben extrahiert und gereinigt. Die spezifische Aktivität im Ansatz betrug 3333 cpm/pmol ^{3}H-UTP. Alle angegebenen Werte für ^{3}H beziehen sich auf eine Kernmenge von 2 x 10^6. In vivo ^{32}P-markierte 5S RNA wurde der Proben-RNA als interner Standard zur Berechung der Hybridisierungseffizienz zugesetzt (Reeder und Roeder, 1972). Die Anzahl der 5S RNA Moleküle wurde nach dem Befund von Hatlen et al., (1969) berechnet, daß 5S RNA aus HeLa-Zellen pro Molekül 27 Uridinreste enthält.

Aus der Tabelle kann man entnehmen, daß in 20 bzw. 40 Minuten von 2 x 10^6 Kernen 0,035 bzw. 0,059 pmol 5S RNA synthetisiert werden. Das entspricht einer Zahl von 10 500 bzw. 17 700 Molekülen 5S RNA pro Kern. Die Umrechnung erfolgte durch

Multiplikation mit der Avogadroschen Zahl. Bei einer längeren Inkubationszeit als 40 Minuten flachte die Synthesekurve stark ab. Da die Anzahl der Gene für 5S RNA in HeLa-Zellen nach neueren Untersuchungen mit 1000-2000 pro diploidem Genom angegeben wird, weist das Ergebnis dieses Versuchs darauf hin, daß die 5S RNA-Synthese einer ständigen Reinitiation durch die endogene Polymerase C unterliegt, auch unter der Voraussetzung, daß alle 5S RNA-Gene aktiv sind.
Der prozentuale Anteil der in vitro synthetisierten 5S RNA liegt nach 20 Minuten bei 30% und steigt bei längerer Inkubationsdauer auf 36%. Auch dies ist ein eindeutiges Zeichen für Reinitiation der 5S RNA-Synthese. Dabei ist zu erwähnen, daß die Aktivität des Enzyms A in dem beschriebenen Experiment außerordentlich niedrig war, was zu dem ungewöhnlich hohen Prozentsatz der 5S RNA führte. In den meisten Experimenten dieser Art betrug der Anteil der 5S RNA am in vitro Produkt um 10%, wobei aber ebenfalls die Tendenz zu erkennen war, daß der Prozentsatz der 5S RNA mit längerer Inkubationszeit zunahm.

3.1.3. Größenanalyse der in vitro synthetisierten 5S RNA

Mit der Hybridisierungstechnik allein läßt sich lediglich nachweisen, daß die durch endogene Polymerase C in isolierten Zellkernen synthetisierte RNA präferentiell Sequenzen enthält, die ganz oder teilweise komplementär zur 5S DNA sind. Es ist aber keine Aussage darüber möglich, ob die hybridisierbaren RNA-Sequenzen auch die korrekte Länge der 5S RNA, d.h. 120 Nucleotide, besitzen. Inkorrekte Transkripte, die durch willkürliche Initiation und/oder Termination der endogenen Polymerase C entstehen können, enthalten entweder nur einen Teil der 5S RNA-Sequenzen oder/und zusätzlich am 3' oder 5'-Ende Sequenzen aus den benachbarten Spacerregionen der DNA. Diese Sequenzen lassen sich auf Grund der vollkommenen Heterologie der Spacer von Xenopus und HeLa nicht durch Hybridisierung erfassen. Jedoch resultiert eine solche fehlerhafte Transkription in einer falschen Größe der hybridisierbaren RNA. Größenfraktionierung der in vitro RNA vor

der Hybridisierung ermöglicht eine Untersuchung dieser Fragestellung.

3.1.3.1. Größenfraktionierung der in vitro RNA durch Gelfiltration auf Sephadex G 100

Auf Sephadex G 100 lassen sich RNA-Klassen bis zu einer Größe von ca. 6S gut voneinander trennen. In Abbildung 1 ist das Ergebnis einer solchen Größenfraktionierung der in vitro synthetisierten RNA dargestellt. Als Größenmarker wurde der RNA-Probe in vivo ^{32}P-markierte rRNA, 5S und tRNA zugesetzt, die auf dieser Säule als drei gut voneinander getrennte Gipfel erscheinen, wobei der erste Gipfel der RNA mit dem höchsten Molekulargewicht entspricht. Auch die in vitro ^{3}H-RNA wurde in drei Gipfel aufgetrennt, die der hochmolekularen, der 5S und der prä-tRNA zugeordnet werden können. Hybridisiert man Aliquots der Fraktionen gegen 5S DNA, so erhält man einen einzigen scharfen Gipfel in der Position der 5S RNA, was besagt, daß 5S RNA-Sequenzen nicht in RNA enthalten sind, die kürzer oder länger als 5S RNA ist.

3.1.3.2. Größenfraktionierung der in vitro RNA auf Polyacrylamidgelen

Bei der Größenfraktionierung der RNA kann nicht ausgeschlossen werden, daß Aggregatbildung einzelner RNA-Moleküle eintritt. Durch Elektrophorese der RNA auf 12%igen formamidhaltigen Polyacrylamidgelen wird dieses Problem ausgeschaltet, da Formamid auf RNA denaturierende Wirkung hat. Überdies erreicht man mit 12%igen Polyacrylamidgelen im Bereich der niedermolekularen RNA-Spezies eine bessere Auflösung. Auch hier wurden ^{32}P-Marker (5S RNA und tRNA) mit aufgetragen (Abbildung 2). Die ^{3}H-RNA spaltete sich im niedermolekularen Bereich in zwei Radioaktivitätsgipfel, die der 5S RNA und der prä-tRNA entsprachen. Wieder wurden hybridisierbare Sequenzen nur als sehr scharfer Gipfel in 5S Position gefunden.

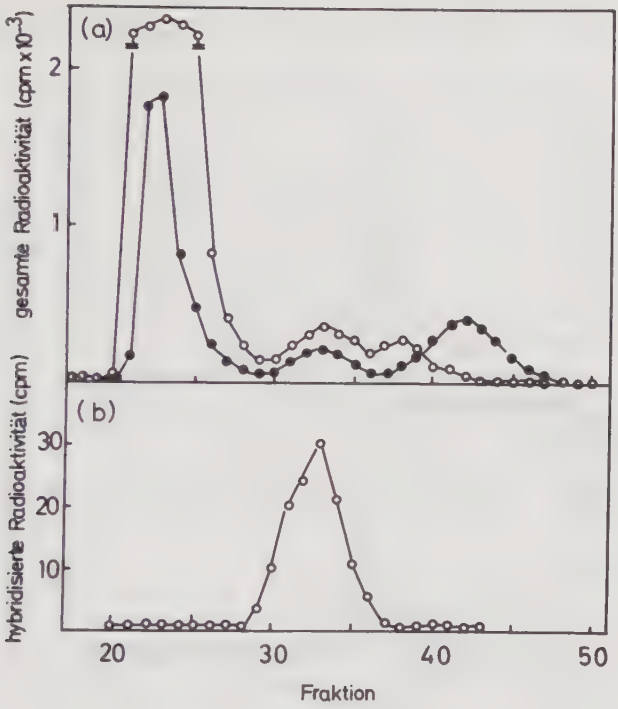


Abb.1:
Größenfraktionierung der in isolierten HeLa-Kernen synthetisierten ^{3}H-RNA durch Gelfiltration auf Sephadex G 100 und Hybridisierung der Fraktionen. ^{32}P-markierte hochmolekulare, 5S und tRNA aus HeLa-Zellen waren als Marker der Probe zugesetzt worden, die der Größe nach eluierten (rRNA = 1. Gipfel, 5S RNA = 2. Gipfel, tRNA = 3. Gipfel)
(a) Elutionsprofil der Säule
(b) Hybridisationsprofil der in vitro RNA
(o) ^{3}H-markierte in vitro RNA
(•) ^{32}P-markierte Marker RNA
Die ^{3}H-Werte geben gleichzeitig die zur Hybridisierung eingesetzten Counts an.

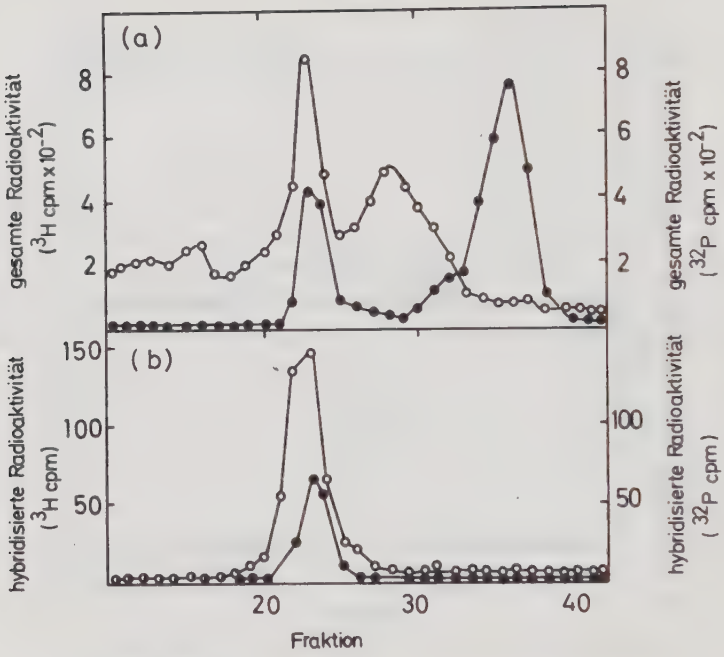


Abb.2:
Analyse der niedermolekularen RNA-Spezies der in vitro in HeLa-Kernen synthetisierten ^{3}H-RNA auf 12%igen Polyacrylamidgelen, die in 99% Formamid polymerisiert worden waren. ^{32}P-markierte 5S RNA und tRNA waren als Marker zugefügt. Die erhaltenen Fraktionen wurden gelöst und hybridisiert.
(a) Radioaktivitätsprofil der Gelelektrophorese
(b) Hybridisationsprofil
(o) ^{3}H-markierte in vitro RNA
(•) ^{32}P-markierte Marker-RNA

3.1.4. Kompetitionshybridisierung der in vitro ^{3}H-RNA

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Spezifität der Transkription eines Gens ist die sogenannte asymmetrische Transkription, die gekennzeichnet ist durch Strangselektivität. Bei der angewendeten Hybridisierungsmethode gegen E. coli Plasmid-5S DNA tritt keine Kreuzhybridisierung der HeLa-DNA mit der E. coli-DNA ein, auch eventuell transkribierte HeLa-5S-DNA-Spacersequenzen hybridisieren auf Grund der Sequenzheterologie nicht mit der 5S-Spacer-DNA von Xenopus mulleri. Man erfaßt jedoch neben der 5S RNA, die vom codogenen Strang synthetisiert wird, auch eventuelle Anti-5S RNA, die vom nichtcodogenen Strang transkribiert wird, da es nicht möglich ist, das 5S-Plasmid oder die aus dem Plasmid mit Restriktionsnucleasen herausgeschnittenen 5S DNA, die aus nur 4 "repeating units" besteht, in ihre beiden komplementären Stränge aufzutrennen.
Mit Hilfe der kompetitiven Hybridisierung, bei der die in vitro ^{3}H-RNA in Gegenwart steigender Mengen unmarkierter in vivo synthetisierter 5S RNA aus Rattenleber hybridisiert wird, läßt sich eine Aussage darüber machen, ob die in vitro synthetisierten hybridisierbaren Sequenzen vom codogenen Strang stammt denn bei ausreichendem Überschuß der unmarkierten RNA sollte nur noch die nicht kompetierte Anti-5S RNA hybridisieren und zwar im Vergleich zu unkompetierter 5S RNA mit einer sehr hohen Effizienz, da keine endogene Anti-5S RNA in Zellkernen vorhanden ist.
Abbildung 3 zeigt ein derartiges Experiment.
Es wird deutlich, daß die Hybridisierung der in vitro RNA durch Kompetierung mit unmarkierter zytoplasmatischer 5S RNA vollständig unterdrückt werden kann. Dieses Ergebnis läßt jedoch nicht den Schluß zu, daß die in vitro 5S RNA zu 100% Transkripte des codogenen Strangs enthält, oder anders ausgedrückt, daß keine Transkripte vom nichtcodogenen Strang existieren. Reeder und Brown (1970) haben nämlich gezeigt, daß Transkripte vom nichtcodogenen Strang in Gegenwart von hohen Konzentrationen Kompetitor-RNA mit dieser Hybride bilden können und somit einer Erfassung durch DNA-RNA-Hybri-

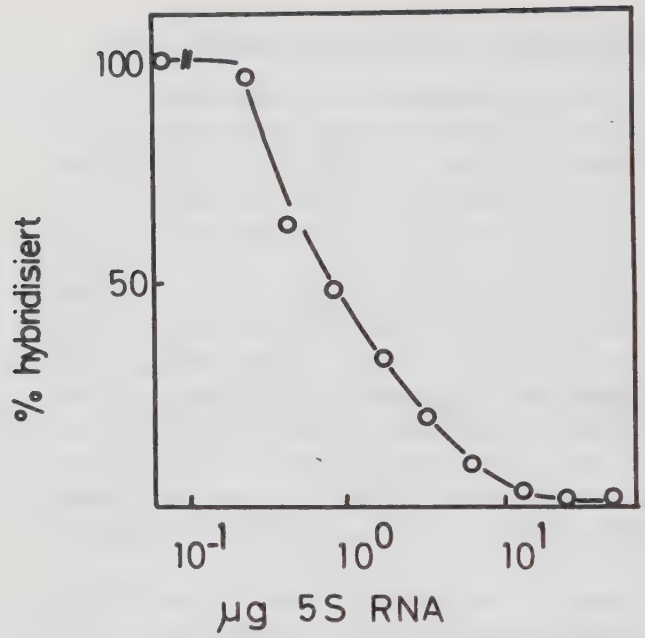


Abb.3:
Kompetitionshybridisierung in isolierten HeLa-Kernen synthetisierter ^{3}H-RNA. Als Kompetitor wurden dem Hybridisierungsgemisch steigende Mengen unmarkierter in vivo 5S RNA aus Rattenleberribosomen zugesetzt. Die RNA war wie unter "Methoden" beschrieben synthetisiert worden, mit der Ausnahme, daß das Inkubationsvolumen verzehnfacht worden war (= 300 µl). 100% Hybridisierung entsprechen 203 cpm.

disierung entzogen werden. Zwei Dinge lassen diese Möglichkeit in dem vorliegenden Fall allerdings wenig wahrscheinlich erscheinen. Erstens ließ sich ebenfalls keine Hybridisierung nachweisen, wenn die DNA-Filter mit einem Überschuß an unmarkierter 5S RNA vorhybridisiert worden waren (s. auch 3.3.2.3.) Zweitens scheint es kaum vorstellbar, daß Transkripte vom nichtcodogenen Strang exakt 5S RNA Größe haben sollten, wie es durch das Hybridisierungsprofil der Polyacrylamidgele gefordert wird.

3.1.5. Oligonucleotidanalyse von in vitro synthetisierter 5S RNA nach Inkubation mit Ribonuclease T_1

RNA wird durch Ribonuclease T_1 an Bindungen, die von Guanin-3'-phosphaten ausgehen, so gespalten, daß daraus Oligonucleotide der Struktur $(Xp)_nGp$ für interne Fragmente und $(Xp)_nX_{OH}$ für die 3'-terminalen Fragmente resultieren. Diese können durch Chromatographie auf DEAE-Sephadex A 25 in 7 M Harnstoff ihrer negativen Ladung und damit ihrer Größe nach aufgetrennt werden.
Abbildung 4 zeigt das Elutionsprofil von ^{3}H-5S RNA aus HeLa-Kernen nach Verdauung mit Ribonuclease T_1 und Größenfraktionierung auf DEAE-Sephadex. Dabei wurde vor der Nucleasebehandlung ^{32}P-18S und 28S RNA aus HeLa-Zellen als Größenmarker zugesetzt. Die aus der Elution der ^{32}P-Oligonucleotide resultierenden Gipfel wurden mit den römischen Zahlen I-XIII bezeichnet, um die in dem betreffenden Fragmenten enthaltene Anzahl der Nucleotide anzugeben. Der dominierende und für rRNA charakteristische Peak I enthält Gp mit der Ladung (-2), Peak II enthält XpGp usw.
Die Nucleotidsequenz von HeLa-5S RNA ist bekannt (Hatlen et al., 1969; Vigne und Jordan, 1977), so daß sich vorhersagen läßt, welche Oligonucleotide zu erwarten sind.
Ein Vergleich des Oligonucleotidmusters von in vitro 5S RNA und in vivo 5S RNA aus HeLa-Zellen zeigt eine weitgehende Übereinstimmung der beiden RNAs hinsichtlich der internen Oligonucleotide, so daß die Existenz größerer Mengen von Sequenzen von anticodogenen DNA-Strang ausgeschlossen werden kann. Da die beiden Proben auf verschiedenen Säulen chromatographiert wurden, ist der Elutionspunkt der Oligonucleotide im Verhältnis zur Marker-RNA wichtiger als der absolute Elutionspunkt.

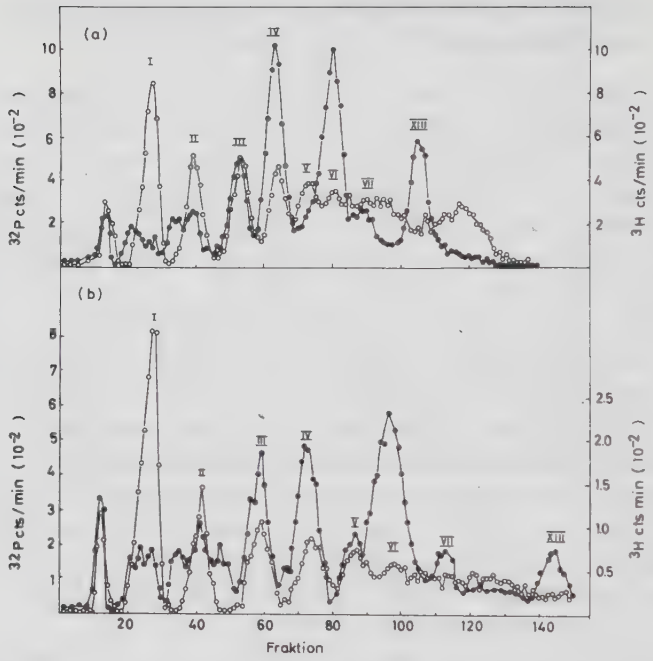


Abb.4:
Analyse der Oligonucleotide von in vitro synthetisierter 5S RNA nach Verdauung mit Ribonuclease T_1. ^{3}H-markierte 5S RNA wurde in Gegenwart von ^{32}P-markierter 18S und 28S RNA aus HeLa-Zellen als Marker mit Ribonuclease T_1 verdaut. Das Oligonucleotidgemisch wurde wie unter "Methoden" beschrieben auf einer DEAE-Sephadex-A 25-Säule (0,6 x 23 cm) in Gegenwart von 7 M Harnstoff chromatographiert. Parallel dazu wurde in vivo ^{3}H-5S RNA aus HeLa-Zellen nach identischer Behandlung auf einer zweiten Säule chromatographiert.

(a) in vivo 5S RNA
(b) in vitro 5S RNA
(●) ^{3}H-5S RNA
(o) ^{32}P-markierte hochmolekulare ribosomale RNA als interner Marker.

3.2. Transkription von ribosomaler 5S RNA an isoliertem HeLa-Chromatin durch endogene RNA-Polymerasen

Die bisher beschriebenen Versuche hatten gezeigt, daß die in isolierten HeLa-Zellkernen enthaltene Polymerase C die 5S RNA Gene über einen längeren Zeitraum und spezifisch transkribiert. Das Chromatin stellt insofern ein spezialisierteres System dar als ein großer Teil der nuclearen Proteine während der Chromatinpräparation entfernt wird. Deshalb stellt sich die Frage, ob auch unter diesen Bedingungen die Spezifität der Transkription der 5S RNA Gene erhalten bleibt, da die Möglichkeit besteht, daß Faktoren, die eine Kontrolle über die Transkription ausüben, eliminiert werden.

3.2.1. Präparation des Chromatins

Das für die folgenden Experimente verwendete Chromatin stellt im Grunde wenig mehr dar als lysierte Kerne. Hohe Salzkonzentrationen und divalente Kationen während der Chromatinpräparation wurden vermieden, da bekannt ist, daß unter diesen Bedingungen Austausch chromosomaler Proteine möglich ist (Clark und Felsenfeld, 1971). Es wurden Substanzen zugesetzt, die die Stabilität der labilen RNA-Polymerasen verbessern (DTT, Glycerin). Das Resultat war, daß die Aktivität der endogenen Polymerasen A und C im Chromatin in etwa der in isolierten Kernen vergleichbar war. Charakteristisch für dieses Chromatin ist der hohe Gehalt an Protein (DNA: Protein = 1:1). Wenn man davon ausgeht, daß chromatingebundene Proteine eine regulatorische Wirkung auf die Transkription haben, ist dieses ein für derartige Untersuchungen geeignetes Chromatin.

3.2.2. Kinetik der Synthese von 5S RNA durch endogene Polymerase in isoliertem HeLa-Chromatin

Abbildung 5 zeigt, daß auch in isoliertem Chromatin die Fähigkeit zur Synthese von 5S RNA über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt (A). Wie schon in Kernen zu beobachten war, verschiebt sich auch hier mit zunehmender Inkubationszeit das Verhältnis von Gesamt-RNA zu 5S RNA immer mehr zugunsten

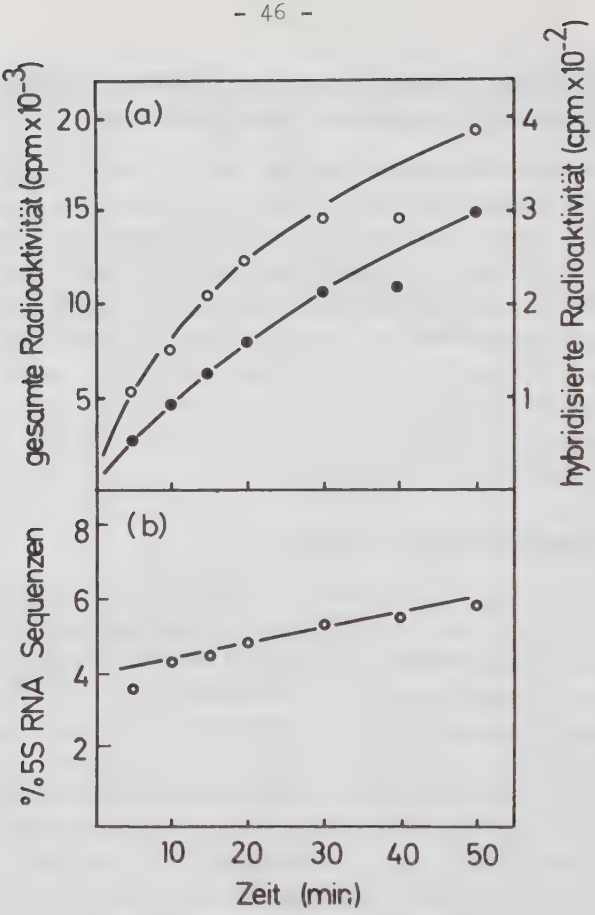


Abb.5:
Kinetik der 5S RNA-Synthese in isolierten HeLa-Chromatin. Die RNA-Synthese wurde wie in "Methoden" beschrieben, mit 50 mM NH_4Cl als Salz, ausgeführt und die RNA extrahiert. Die eingesetzte Radioaktivität und der Anteil an hybridisierbaren 5S RNA-Sequenzen wurde bestimmt. Alle dargestellten Werte beziehen sich auf eine äquivalente Kernmenge von $1,2 \times 10^6$. Die Hybridisierungseffizienz betrug 26,7% und die spezifische Radioaktivität 2967 cpm/pmol.

(A) in vitro ^{3}H-RNA
  (o) Gesamtsynthese, gleichzeitig die eingesetzte Radioaktivität für die Hybridisierung
  (•) An 5S DNA hybridisierte Radioaktivität

(B) Prozentualer Anteil der 5S RNA-Sequenzen

der 5S RNA (B). Dies weist auf Reinitiation der 5S RNA-Synthese auch im isolierten Chromatin hin.
Das Ausmaß der 5S RNA-Synthese im Chromatin lag deutlich niedriger als in Kernen. Wie aus Tabelle 2 zu erkennen ist, betrug die Anzahl der 5S RNA-Moleküle, die innerhalb von 50 Minuten in Chromatin synthetisiert wurden, noch 7000, was aber noch deutlich über der Anzahl der 5S RNA-Gene lag und Reinitiation der Synthese beweist.

Tab.2:
Diese Tabelle enthält einige Zahlenwerte, die Abb.5 zugrunde liegen. Alle Werte sind für eine äquivalente Kernmenge von 2 x 10^6 umgerechnet worden. Die Angaben für hybridisierte Radioaktivität wurden auf 100% Hybridisierungseffizienz berechnet.

Zeit (min)	gesamte ^{3}H-RNA (cpm)	hybridisierte ^{3}H-RNA (cpm)	^{3}H-5S RNA (pmol x 10^{-3})	Moleküle ^{3}H-5SRNA äquival. Kernmenge	% 5SRNA
20	20108	980	12,2	3660	4,86
50	31958	1943	24,3	7290	6,08

3.2.3. Salzabhängigkeit der 5S RNA-Synthese in HeLa-Chromatin

Anfangs wurden alle Versuche mit Chromatin in Anlehnung an die Kernexperimente mit Ammoniumchlorid (50 mM) als Salz durchgeführt. Da es aber nicht möglich war, die exogenen RNA-Polymerasen aus HeLa-Zellen, die für weitergehende Experimente eingesetzt werden sollten, frei von Ammoniumsulfat und aktiv zu erhalten (s. Methoden), mußte Ammoniumchlorid in den Inkubationsansätzen durch Ammoniumsulfat ersetzt werden.
Da Ammoniumsulfat-Lösungen im Vergleich zu Ammoniumchloridlösungen gleicher Molarität eine höhere Ionenstärke aufweisen, ist die Wirkung auf die RNA-Synthese stärker ausgeprägt, so daß das Maximum der Synthese bei niedrigeren Salzkonzen-

trationen erreicht wird als mit Ammoniumchlorid.
Wie aus Abbildung 6 zu ersehen ist, lag das Optimum für die 5S RNA-Synthese zwischen 25 und 40 mM. Schon ab 50 mM sank die 5S RNA-Synthese unter das Niveau, das ohne jeglichen Salzzusatz erreicht wird. Dagegen lag das Optimum für die gesamte RNA-Synthese, die zum größten Teil auf Polymerase A zurückzuführen ist, bei 50-70 mM. Auch wurde hier ein viel langsamerer Abfall der Syntheserate bei höheren Salzkonzentrationen beobachtet.
Eine Salzkonzentration von 25 mM Ammoniumsulfat wurde für alle weiteren Experimente mit Chromatin deswegen gewählt, weil der relative Anteil der 5S RNA an der Gesamtsynthese bei dieser Konzentration noch verhältnismäßig günstig lag.

3.2.4. Synthese von 5S RNA in HeLa-Chromatin in Abwesenheit und Gegenwart von Heparin

Bei dem unter 3.2.2. beschriebenen Experiment war es nicht möglich abzuschätzen, wie viele der 5S RNA-Gene in isoliertem Chromatin noch aktiv sind. Damit wurde auch eine konkrete Aussage hinsichtlich der Reinitiationsrate schwierig.

In dem folgenden Versuch wurden steigende Mengen Chromatin in Gegenwart und Abwesenheit von Heparin inkubiert. Heparin hat neben seiner inhibierenden Wirkung auf RNasen die Eigenschaft, Initiation und Reinitiation durch RNA Polymerasen zu hemmen, so daß nur noch die Elongation bereits in vivo initiierter RNA-Ketten möglich ist. Angenommen die 5S RNA-Synthese unterliegt in vitro keiner Reinitiation, dann sollte der Einbau von ^{3}H-UMP in 5S RNA durch Heparin nicht beeinflußt werden.
Abbildung 7 zeigt das Ergebnis eines derartigen Experiments. Es konnte kein negativer Effekt von Heparin auf die gesamte RNA-Synthese, die zu ca. 80% auf Polymerase A zurückgeht (s. 3.3.2.1.), festgestellt werden. Die Polymerase A-abhängige RNA-Synthese in vitro beruht also ausschließlich auf Elongation in vivo initiierter RNA-Ketten.
Dagegen weist die drastische Erniedrigung der 5S RNA-Synthese eindeutig auf Reinitiation hin. Diese sollte über-

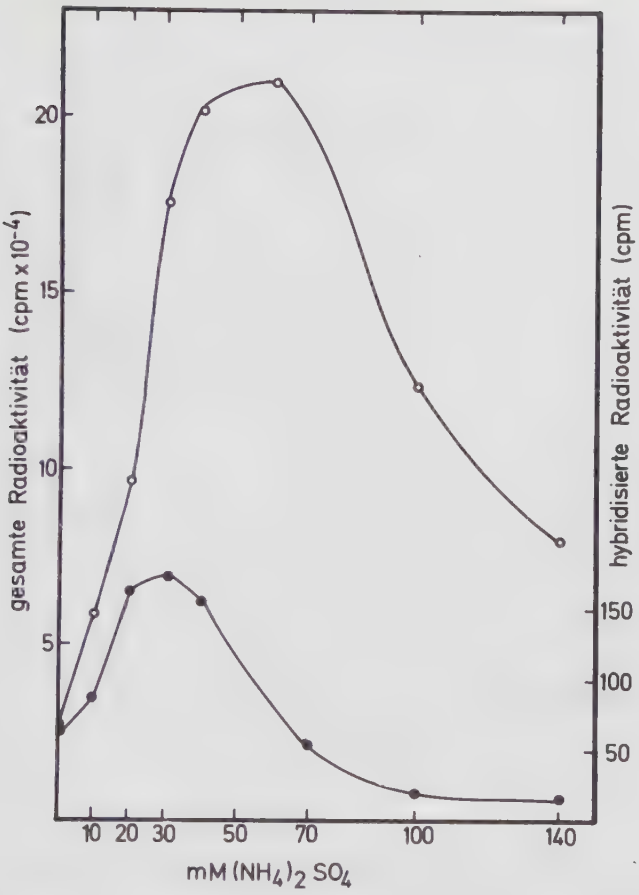


Abb.6:
Salzabhängigkeit der 5S RNA Synthese in isoliertem Chromatin. Chromatin wurde wie unter "Methoden" beschrieben inkubiert. Dabei wurde die Ammoniumsulfatkonzentration wie aus der Abbildung zu entnehmen variiert. Die Proben wurden gegen 5S DNA hybridisiert. Die spezifische Aktivität betrug 2967 cpm/pmol.
(o) Gesamte in vitro ^{3}H-RNA
(•) Hybridisierte in vitro ^{3}H-5S RNA

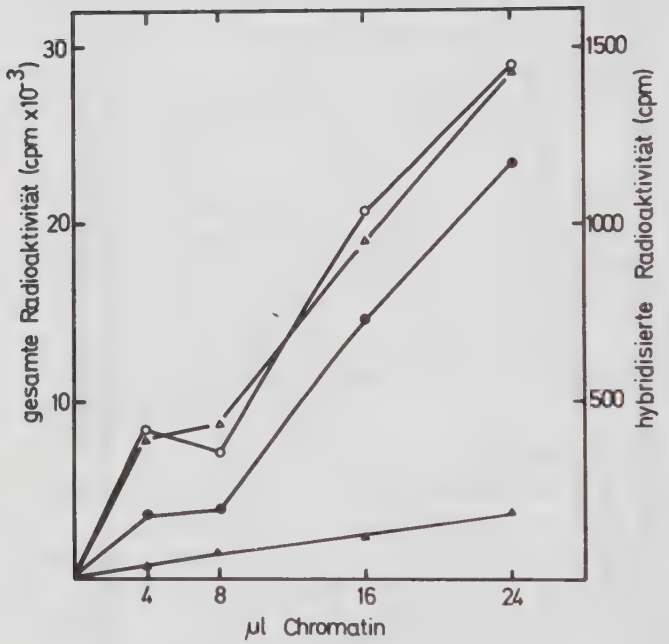


Abb.7:

RNA-Synthese in isoliertem HeLa-Chromatin in Abwesenheit und Gegenwart von Heparin (330 USP/ml).
Steigende Mengen von Chromatinsuspension (mit einer äquivalenten Kernmenge von 6,4 x 10^7/ml) wurden 20 Minuten bei 25°C wie unter "Methoden" beschrieben inkubiert und die RNA extrahiert. Aliquots wurden für die Bestimmung der Gesamtsynthese entnommen und die restliche Lösung gegen 5S DNA hybridisiert. Zu jedem Ansatz wurde ein Mock-Ansatz ausgeführt. Die Hybridisierungseffizienz sank mit steigenden Chromatinmengen von 69% auf 54%. Die in der Abbildung dargestellten Hybridisierungswerte sind bereits auf 100% Hybridisierungseffizienz umgerechnet. Die spezifische Radioaktivität betrug 4399 cpm/pmol.
(o) Gesamte RNA-Synthese ohne Heparin
(●) An 5S DNA hybridisierte Radioaktivität ohne Heparin
(△) Gesamte RNA-Synthese mit Heparin
(▲) An 5S DNA hybridisierte Radioaktivität mit Heparin

	Chromatinmenge (äquivalente Kernmenge)	gesamte RNA-Synthese (cpm)	hybridisierte 5S RNA (cpm)	Hybridisierungseffizienz	korrigierte Hybridwerte (cpm)	Differenz der Hybridwerte (-)Heparin - (+)Heparin	^{3}H-5S RNA (pmolx10^3) nur elongiert	nur reinitiiert	Anzahl der 5S RNA Moleküle/Kernäquivalent nur elongiert	nur reinitiiert
(+) Heparin	4µl (o,258x10^6)	8117	27	68,9	39	-	0,656	-	1525	-
	8 µl (0,51 x10^6)	8948	52	63,1	82	-	1,38	-	1623	-
	16 µl (1,03 x10^6)	19148	69	60,5	114	-	1,92	-	1118	-
	24 µl (1,55 x10^6)	28768	107	54,1	197	-	3,32	-	1285	-
(-) Heparin	4 µl (0,258x10^6)	8237	123	68,4	179	140	-	1,18	-	2744
	8 µl (0,51 x10^6)	7183	125	65,2	191	109	-	0,92	-	1082
	16 µl (1,03 x10^6)	20848	473	64,1	737	623	-	5,24	-	3052
	24 µl (1,55 x10^6)	28945	643	54,8	1173	976	-	8,22	-	3181

Tab.3: RNA-Synthese an HeLa-Chromatin durch die endogenen RNA-Polymerasen A und C in Abwesenheit und Gegenwart von Heparin (330 USP/ml). Steigende Mengen von Chromatin wurden wie unter "Methoden beschrieben inkubiert. Alle cpm-Werte beziehen sich auf die angegebenen äquivalenten Kernmengen. Für die Berechnung der pro Kernäquivalent synthetisierten Anzahl der 5S RNA-Moleküle wurde zugrunde gelegt, daß ein HeLa-5S RNA-Molekül 27 Uridinreste enthält. Um getrennt berechnen zu können, wie viele Moleküle durch Reinitiation und nur durch Elongation synthetisiert wurden, wurden die Hybridwerte der Ansätze mit Heparin von denen ohne Heparin subtrahiert. Zur Berechnung der allein durch Elongation synthetisierten RNA-Moleküle muß eine Zahl von 13 Uridinresten veranschlagt werden, da die Polymerasemoleküle zu Beginn der Inkubation gleichmäßig über die 5S RNA-Gene verteilt waren.

wiegend an den Genen möglich sein, die auch in Gegenwart von Heparin 5S RNA-Synthese durch Elongation zeigen.
In Tabelle 3 sind die Werte des in Abbildung 7 dargestellten Experiments zusammengefaßt, die zur Berechung
(a) der Anzahl der aktiven 5S RNA-Gene
(b) der Anzahl der pro Kern synthetisierten 5S RNA-Moleküle
(c) der Reinitiationsrate
nötig sind.
Aus der Tabelle ist zu entnehmen, daß pro Kern 1100-1600 bereits initiierte 5S RNA-Moleküle fertiggestellt werden. Diese Zahl entspricht der Anzahl der noch aktiven Gene. In Abwesenheit von Heparin werden zusätzlich 2700-3100 5S RNA Moleküle pro Kern synthetisiert, was einer Reinitiationsrate von ca. 3 pro Gen in 20 Minuten entspricht.

3.2.5. Größenanalyse der in vitro synthetisierten RNA

Größenfraktionierung der durch endogene Polymerasen an HeLa-Chromatin synthetisierten RNA durch Gelfiltration auf Sephadex G 100 und formamidhaltigen Polyacrylamidgelen lieferte im wesentlichen das gleiche Bild, das schon für die RNA, die in isolierten Kernen synthetisiert wurde, erhalten worden war. Durch Gelfiltration (Abbildung 8) wurde die in vitro synthetisierte RNA in drei Gipfel aufgespalten, rRNA, 5S RNA und prä-tRNA. Hybridisierbare RNA-Sequenzen erschienen nur im 5S Bereich. Diese Ergebnisse wurden durch Fraktionierung der in vitro RNA auf Polyacrylamidgelen gestätigt (Abbildung 9). Beide Größenfraktionierungen wurden in Gegenwart von ^{32}P-markierter in vivo RNA (rRNA, 5S RNA und tRNA) durchgeführt.

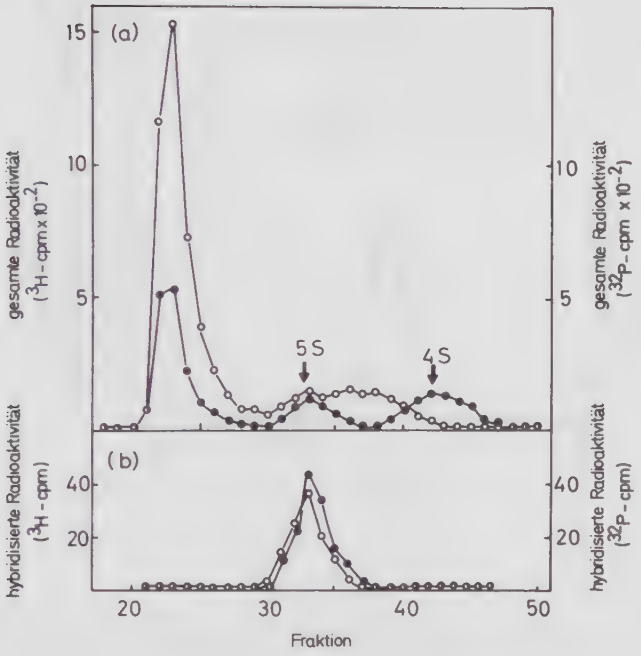


Abb.8:
Gelfiltration der in isoliertem Chromatin durch endogene Polymerasen synthetisierten RNA auf Sephadex G 100 und Hybridisierung der Fraktionen. Als Größenmarker wurde ^{32}P-markierte in vivo RNA aus HeLa-Zellen (rRNA, 5S RNA und tRNA) mit chromatographiert.
(a) Radioaktivitätsprofil der Säule
(b) Hybridisierung der Fraktionen an 5S DNA
(o) ^{3}H-in vitro RNA
(•) ^{32}P-in vivo RNA

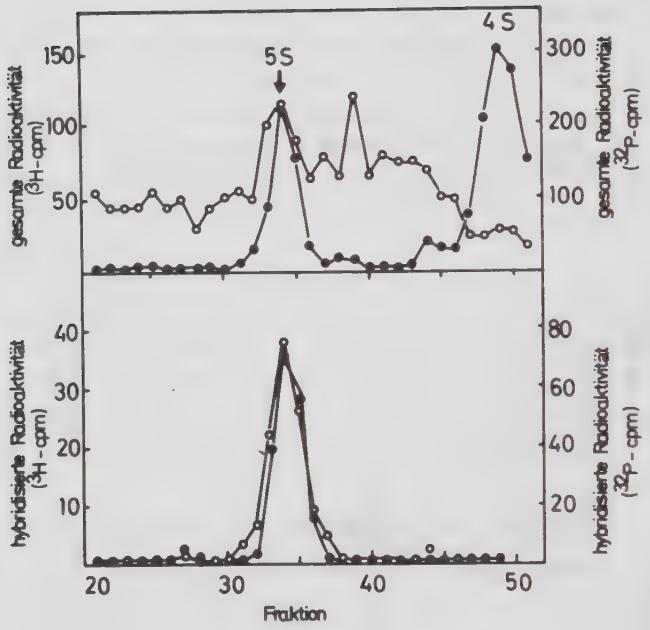


Abb.9:

Polyacrylamidgelelektrophorese der an isoliertem Chromatin durch die endogenen Polymerasen synthetisierten RNA auf formamidhaltigen Gelen und Hybridisierung der Fraktionen. Als Größenmarker wurde in vivo ^{32}P-markierte 5S RNA und tRNA aus HeLa-Zellen zugefügt.

oben: Radioaktivitätsprofil des Gels, gleichzeitig die zur Hybridisierung eingesetzte Radioaktivität

unten: Hybridisierung der Fraktionen an 5S DNA

(o) ^{3}H-in vitro RNA

(•) ^{32}P-in vivo RNA

3.3. Transkription von ribosomaler 5S RNA in HeLa-Chromatin durch exogene RNA-Polymerasen

Die bisher beschriebenen Versuche zeigten, daß auch in HeLa-Chromatin die 5S RNA-Gene von der endogenen Polymerase C korrekt transkribiert werden. Darüber hinaus war es notwendig zu untersuchen, ob und wie spezifisch die 5S RNA-Gene durch exogene RNA-Polymerasen unterschiedlicher Herkunft transkribiert werden.

3.3.1. Transkription von isoliertem HeLa-Chromatin durch E. coli RNA-Polymerase

E. coli Polymerase wurde bisher von vielen Autoren für Transkriptionsversuche eingesetzt, da sie käuflich in gereinigter Form erhältlich ist.
In einem ersten Experiment wurden HeLa-Chromatin steigende Mengen von E. coli Polymerase zugesetzt (bis 0,8 Einheiten) und die in vitro RNA auf 5S RNA-Sequenzen analysiert. Abbildung 10 zeigt, daß proportional zu den zugefügten Polymerase-Mengen der gesamte Einbau von ^{3}H-UMP in RNA stark anstieg. Jedoch spiegelte sich diese vermehrte RNA-Synthese nicht in einem gleichzeitigen Anstieg der Synthese von 5S RNA wieder (A), was zur Folge hatte, daß der prozentuale Anteil der 5S RNA an der Gesamtsynthese proportional absank (B). Erst bei Polymerasekonzentrationen ab 0,8 Einheiten, bei der die gesamte RNA-Synthese schon das Vierfache der endogenen Synthese betrug, schien sich eine leichte Zunahme der hybridisierbaren Sequenzen anzudeuten.
In einem zweiten Versuch wurde Chromatin mit höheren E. coli Polymerase-Mengen inkubiert (1-10 Einheiten), das RNA-Produkt durch Polyacrylamidgelelektrophorese und Chromatographie auf Sephadex G 100 fraktioniert und hybridisiert.
Abbildung 11 zeigt die Hybridisierung der Fraktionen eines Polyacrylamidgels, auf dem in vitro RNA eines Ansatzes von Chromatin mit 2 Einheiten E. coli Polymerase aufgetrennt worden war. Als Vergleich ist auch das Hybridisationsprofil von in vitro RNA, die durch endogene Polymerasen syntheti-

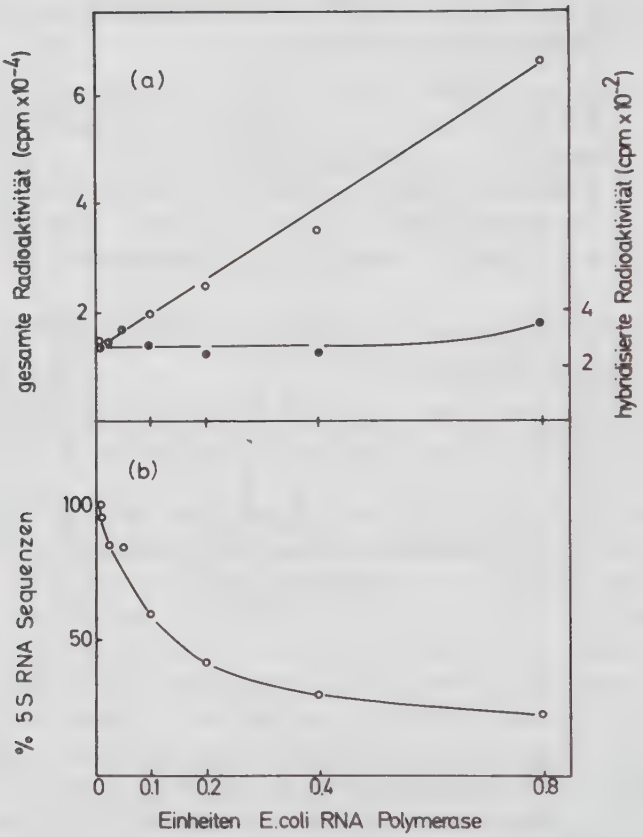


Abb. 10:
RNA-Synthese in isoliertem HeLa-Chromatin mit steigenden Mengen von E. coli Polymerase und Hybridisierung der in vitro RNA an 5S DNA

(a) Gesamte RNA-Synthese (o) und an 5S DNA hybridisierte Radioaktivität (•)

(b) Prozentualer Anteil der 5S in vitro RNA im Vergleich zur gesamten RNA-Synthese

1 Einheit E. coli RNA-Polymerase inkorporiert in 10 Minuten bei 37°C mit nativer E. coli DNA als Matrize 1000 pmol UMP in RNA.

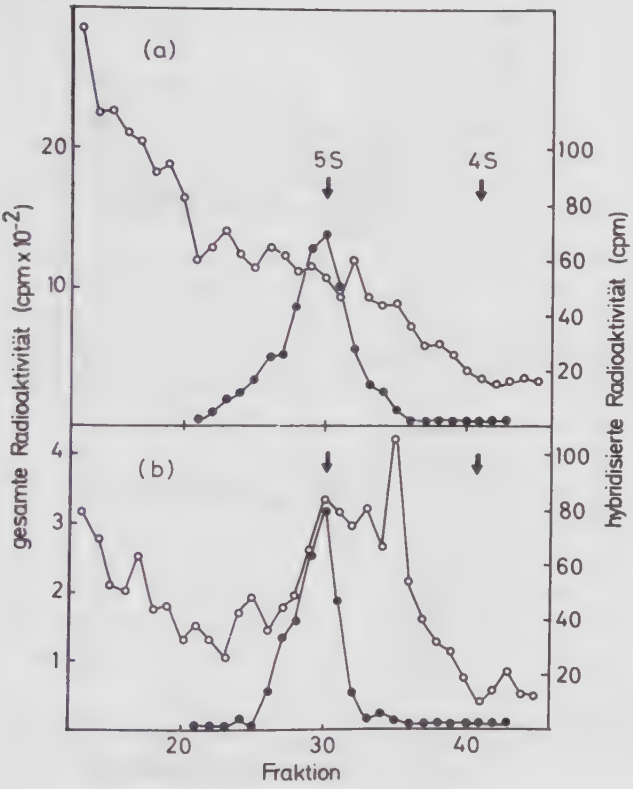


Abb. 11:
Elektrophorese in vitro in isoliertem HeLa-Chromatin synthetisierter RNA auf formamidhaltigen 12%igen Polyacrylamidgelen und Hybrisierung der Fraktionen. ^{32}P-markierte tRNA und 5S RNA waren als Größenmarker zugesetzt worden. Die Position der Marker-RNAs ist durch die Pfeile angegeben.
(a) Die RNA-Synthese wurde in Gegenwart von 2 Einheiten E. coli Polymerase durchgeführt.
(b) RNA-Synthese in Chromatin durch endogene RNA-Polymerasen
(o) Radioaktivitätsprofil, gleichzeitig die zur Hybridisierung eingesetzte Radioaktivität
(●) Hybridisierbare RNA-Sequenzen

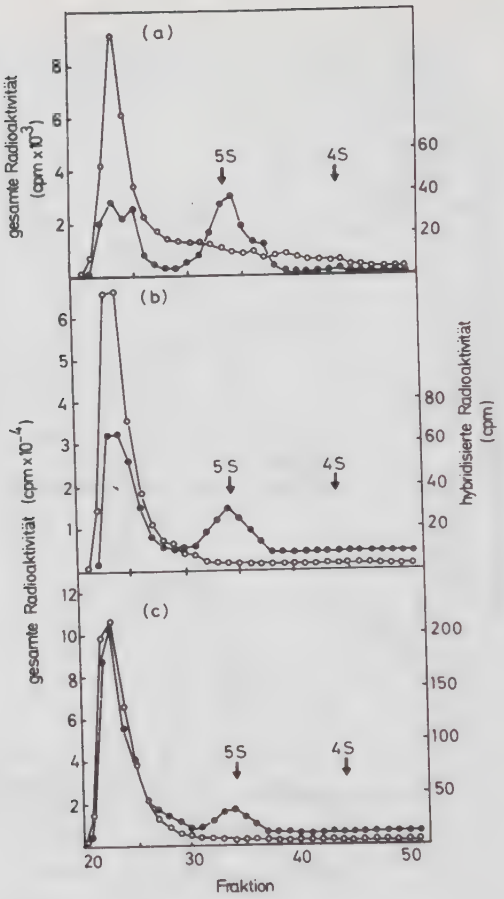


Abb.12:
Größenfraktionierung von RNA, die in isoliertem HeLa-Chromatin mit 1 Einheit (a), 5 Einheiten (b) und 10 Einheiten (c) E. coli Polymerase synthetisiert worden war, auf Sephadex G 100 und Hybridisierung der Fraktionen. Die Pfeile geben die Position der zugesetzten ^{32}P-Marker-RNA an.
(o) Radioaktivitätsprofil, gleichzeitig die zur Hybridisierung eingesetzte Radioaktivität
(•) Hybridisierbare RNA-Sequenzen

siert worden war, mit dargestellt. Gegenüber der RNA-Synthese durch die endogenen Polymerasen ist mit E. coli Polymerase ein ca. 10facher Anstieg der gesamten Radioaktivität im 5S Bereich zu beobachten. Am Radioaktivitätsprofil wird aber deutlich, daß die Transkripte der E. coli Polymerase sehr viel heterogener in der Größe sind als die der endogenen Polymerasen. Abbildung 12 zeigt die Fraktionierung der RNA, die an Chromatin mit 1, 5 und 10 Einheiten E. coli Polymerase synthetisiert wurde, auf Sephadex G 100 und die Hybridisierung der einzelnen Fraktionen. Durch diese Polymerasemengen wurde die gesamte RNA-Synthese um das 5-50-fache gesteigert. Während auch hier die hybridisierbaren Sequenzen im 5S Bereich konstant blieben, fand sich zusätzliches hybridisierbares Material im hochmolekularen Bereich (>6S) der Sephadex-Säule. Da die Hybridisierung in diesem Bereich mit steigenden E. coli Polymerasemengen zunahm, muß es sich hierbei um RNA-Sequenzen handeln, die durch E. coli Polymerase synthetisiert wurden. Diese 5S RNA-Sequenzen enthaltende RNA kann nur durch unspezifische Initiation und Termination der E. coli Polymerase an der DNA zustande gekommen sein.

3.3.2. Transkription von ribosomaler 5S RNA mit exogener HeLa-RNA-Polymerase C

3.3.2.1. Polymerase A-haltiges Enzym C

Um die Wirkung von exogener HeLa-Polymerase C auf die Transkription der 5S RNA-Gene zu untersuchen, wurde Chromatin in Gegenwart von zwei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen (1 und 6 Einheiten Polymerase C) inkubiert. Dabei wurde für diesen Versuch zuerst absichtlich eine relativ wenig gereinigte Enzympräparation gewählt, um der Gefahr zu entgehen, eventuelle mit der Polymerase assoziierte und die Spezifität der Transkription beeinflussende Proteinfaktoren zu entfernen. Das Enzym war lediglich durch Chromatographie auf DEAE-Cellulose gereinigt worden und enthielt folglich noch RNA Polymerase A. Das Verhältnis der Aktivitäten der bei-

den Polymerasen betrug an DNA 1:1.
Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Tabelle 4 zusammengefaßt.

α-Amanitin (µg/ml)	exogene Polymerase (Einheiten)	gesamte Radioakt. (cpm)	Hybridisierte Radioakt. (cpm)	Hybrid. eff. (%)	auf 100% korrigierte Hybridisierung (cpm)	% 5SRNA
0,5	-	33 600	469	24,8	1889	5,62
	1	38 730	672	22,5	3987	10,29
	6	70 475	1132	21,0	5390	7,64
200	-	27 930	83	23,0	360	1,28
	1	22 810	80	22,0	363	1,59
	6	37 845	83	25,8	321	0,85

Tab. 4:
RNA-Synthese in isoliertem HeLa-Chromatin mit exogener HeLa-Polymerase C (Polymerase A-haltig).
Die Inkubation wurde wie unter "Methoden" beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, daß als Salz 50 mM Ammoniumchlorid verwendet wurde. Die spezifische Aktivität betrug 11086 cpm/pmol. Eine Einheit Polymerase baut an nativer Kalbsthymus-DNA als Matrize in 20 Minuten 1 pmol UMP in RNA ein.
Alle Werte der Tabelle gelten für eine äquivalente Kernmenge von $1,86 \times 10^6$. Für alle Ansätze wurden Mock-Ansätze (vgl. 2.2.7.) ausgeführt.
Einem Teil der Proben wurde 200 µg/ml α-Amanitin zugesetzt, um die Aktivität der endogenen und exogenen Polymerase A getrennt erfassen zu können.

Die in dieser Tabelle zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß sowohl mit 1 Einheit als auch mit 6 Einheiten Polymerase C ein merklicher Anstieg der 5S RNA-Synthese zu verzeichnen war. Die Zunahme der gesamten RNA-Synthese war im Vergleich zu dem Versuch mit exogener E. coli Polymerase recht gering, und ging zu einem Teil noch auf das exogene Enzym A

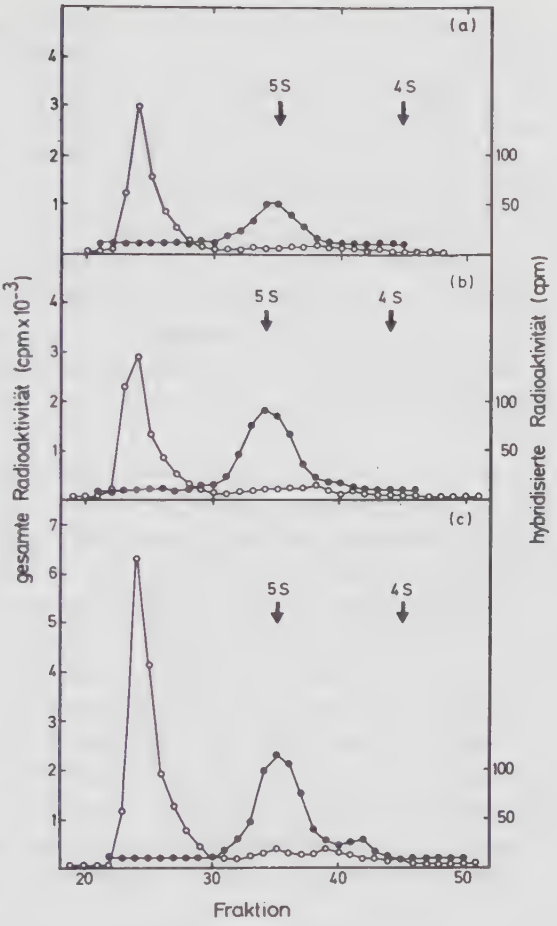


Abb.13:
Gelfiltration von RNA, die in isoliertem Chromatin synthetisiert worden war, auf Sephadex G 100 und Hybridisierung der Fraktionen.
(A) RNA-Synthese durch endogene RNA-Polymerasen
(B) RNA-Synthese mit 1 Einheit exogener homologer RNA-Polymerase C (Polymerase A-haltig)
(C) RNA-Synthese mit 6 Einheiten exogener homologer RNA-Polymerase C (Polymerase A-haltig)
Das Enzym C war nicht frei von Polymerase A, die angegebenen Einheiten beziehen sich aber nur auf die Aktivität der Komponente C. Eine Einheit Polymerase baut in 20 Minuten bei 25°C mit nativer Kalbsthymus-DNA als Matrize 1 pmol UMP in RNA ein.
(o) Radioaktivitätsprofil, entspricht eingesetzter Radioaktivität für die Hybridisierung
(•) Hybridisierbare 5S RNA-Sequenzen

zurück. Dagegen war das exogene Enzym A aber nicht an der Synthese von 5S RNA beteiligt. Dies ließ sich aus den Ergebnissen für die Ansätze entnehmen, die während der Inkubation 200 µg/ml α-Amanitin enthielten. Bei dieser α-Amanitinkonzentration ist nur noch die Polymerase A aktiv. Man konnte beobachten, daß die 5S RNA-Synthese vollkommen ausfiel, während die gesamte RNA-Synthese deutlich anstieg. Für die 5S RNA-Synshese war also als einzige Komponente des exogenen Enzymgemischs die Polymerase C verantwortlich.

Außerdem läßt sich der Tabelle entnehmen, daß ca. 80% der RNA-Synthese durch die endogenen Polymerasen auf Polymerase A zurückzuführen war.

Fraktionierte man die durch Polymerase A-haltiges Enzym C synthetisierte RNA auf Sephadex G 100 (Abbildung 13), so fand man bei Hybridisierung der Fraktionen, daß die durch dieses Enzym synthetisierten 5S RNA-Sequenzen alle exakt im 5S Bereich lokalisiert waren, was sich in einer deutlichen Verstärkung des Hybridisationsgipfels bemerkbar machte. Ganz im Gegensatz zu E. coli Polymerase erschienen im hochmolekularen Bereich keine hybridisierbaren Sequenzen. Daß diese erhöhte Synthese von 5S RNA nicht durch das exogene Enzym A verursacht wurde, ließ sich auch hier durch Fraktionierung und Hybridisierung von in vitro RNA, die in Gegenwart von 200 µg/ml α-Amanitin synthetisiert worden war, nachweisen. In keinem Teil der Chromatographie trat dann hybridisierbares Material auf.

3.3.2.2. Transkription der 5S RNA-Gene in vitro durch gereinigte exogene HeLa-Polymerase C und ihre Unterformen C_1 und C_2

Als nächstes war zu untersuchen, ob auch bei einer weiter gereinigten Polymerase C die Spezifität hinsichtlich der 5S RNA-Gene erhalten bleibt. Darüber hinaus war es interessant, zu überprüfen, ob sich die beiden Unterformen der Polymerase C, C_1 und C_2, die chromatographisch voneinander getrennt

werden können, in ihrer Transkriptionsspezifität unterscheiden.
Die Polymerase C wurde aus HeLa-Zellen durch Chromatographie auf DEAE-Cellulose und DEAE-Sephadex isoliert und war frei von anderen Polymerasen. Bei einer Präparation gelang es, das Enzym in seine beiden Unterformen aufzutrennen, allerdings nicht ohne geringfügige gegenseitige Verunreinigung. Abbildung 14 zeigt das Aktivitätsprofil dieser Präparation nach Chromatographie auf DEAE-Sephadex A 25.
In Tabelle 5 ist ein Versuch dargestellt, in dem Chromatin mit steigenden Mengen exogener HeLa-Polymerase C_1 und C_2 transkribiert wurde. Die in vitro RNA wurde durch Hybridisierung auf 5S RNA hin analysiert.

exogene Polymerase	Einheiten	gesamte ^{3}H-RNA (cpm)	hybridisierte ^{3}H-RNA (cpm)	korrigierte hybridisierte 5S RNA (cpm)	% 5S RNA
-	-	16 240	331	624	3,84
C_1	5,14	19 025	545	1028	5,41
C_1	10,28	21 725	616	1162	5,34
C_1	25,36	21 430	629	1186	5,53
C_2	1,64	23 180	508	958	4,13
C_2	9,84	21 680	506	954	4,40

Tab.5:
RNA-Synthese in isoliertem HeLa-Chromatin mit exogener HeLa-Polymerase C_1 und C_2.
Chromatin wurde wie in "Methoden" beschrieben inkubiert, die RNA extrahiert und hybridisiert. Die Hybridisierungseffizienz betrug 53%, wie sich aus parallelen Mock-Ansätzen ergab, und die spezifische Aktivität 6545 cpm/pmol. Alle ^{3}H-Werte beziehen sich auf eine äquivalente Kernmenge von $1{,}05 \times 10^6$.

Sowohl durch Enzym C_1 als auch durch Enzym C_2 wurde die 5S RNA-Synthese stimuliert, wobei mit beiden Enzymen eine Sättigung des Systems zu erkennen war. Diese schien für Polymerase

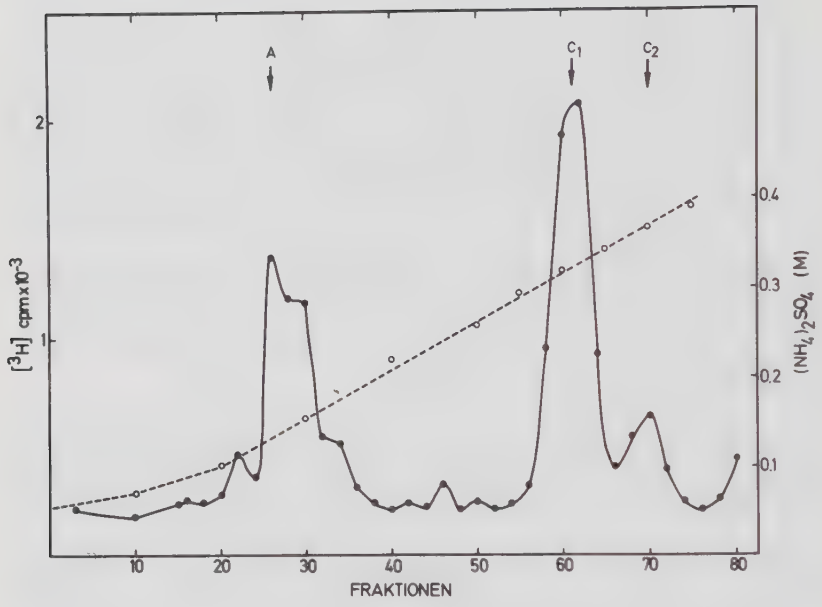


Abb.14:
Elutionsprofil von HeLa-RNA-Polymerase A und C von DEAE-Sephadex A 25.
Die beiden Polymerasen waren vorher auf DEAE-Cellulose chromatographiert worden, wo sie gemeinsam eluierten. Die Sephadex-Chromatographie wurde wie unter "Methoden" beschrieben durchgeführt. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 0,05-0,45 M Ammoniumsulfat (je 250 ml). Die Fraktionen wurden wie beschrieben getestet. Die Inkubationszeit betrug 45 Minuten. Besonders im Bereich der Enzyme C_1 und C_2 wurde sehr eng gepoolt, um die gegenseitige Verunreinigung der beiden Enzyme so gering wie möglich zu halten.
(•) Aktivitätsprofil, ^{3}H-UMP in RNA
(o) Gradientenverlauf, (M) Ammoniumsulfat.

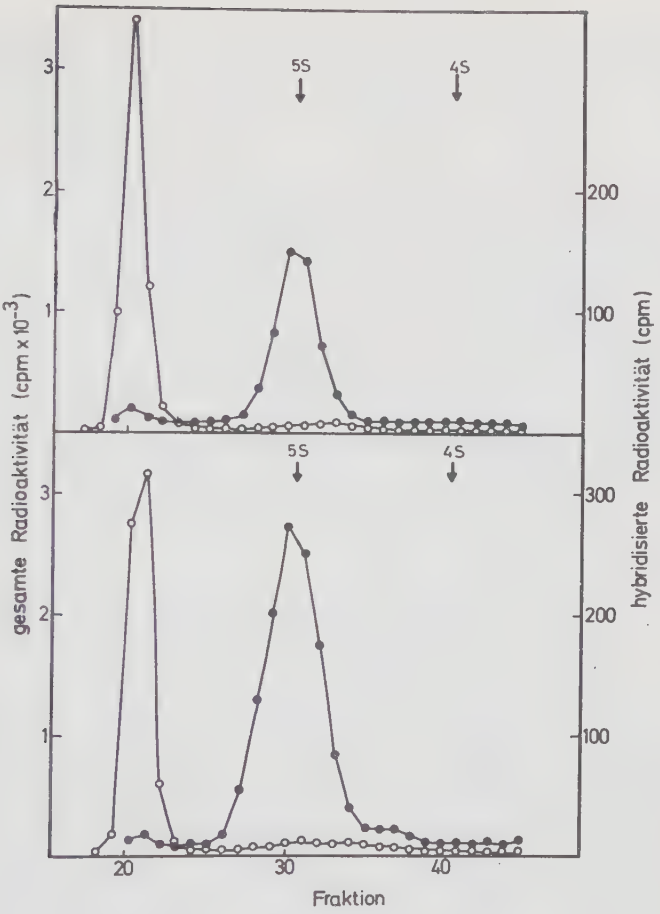


Abb.15:
Gelfiltration der an isoliertem Chromatin synthetisierten RNA auf Sephadex G 100 und Hybridisierung der Fraktionen.
oben: RNA-Synthese durch endogene Polymerasen
unten: RNA-Synthese mit 24,6 Einheiten exogener gereinigter HeLa-Polymerase C
Pro Synthese-Ansatz wurde eine äquivalente Kernmenge von $0{,}82 \times 10^6$ eingesetzt.
(o) Radioaktivitätsprofil der Säule
(•) An 5S DNA hybridisierte Radioaktivität

C_2 bei niedrigeren Konzentrationen und bei einem etwas niedrigeren Hybridisationsniveau erreicht zu sein als für Enzym C_1. Auch die Stimulierung der gesamten RNA-Synthese war für beide Enzyme etwa gleich, was darauf hindeutet, daß beide Enzyme sowohl 5S RNA als auch tRNA synthetisieren.

Größenanalyse dieser in vitro synthetisierten RNA auf Sephadex G 100 zeigte, daß auch die durch die Unterformen der Polymerase C synthetisierten 5S RNA-Sequenzen korrekte 5S RNA Länge besaßen. Das gleiche galt für die in vitro 5S RNA, die durch eine Polymerase C synthetisiert wurde, die nicht in ihre beiden Unterformen aufgetrennt worden war (Abbildung 15). Weder im hochmolekularen Bereich noch in Bereich <5S sind 5S RNA-Sequenzen nachweisbar. Dabei ist von Bedeutung, daß die in diesem Versuch eingesetzte Enzymkonzentration deutlich über der Sättigungskonzentration des Chromatins für Polymerase C lag.

3.3.2.3. Hybridisierung der an Chromatin synthetisierten 5S RNA an vorhybridisierte DNA-Filter

Aus den bisherigen Versuchen war es nicht möglich zu entscheiden, ob die 5S RNA-Synthese an Chromatin mit den endogenen und exogenen Polymerasen asymmetrisch erfolgte, das eine der Voraussetzungen für spezifische Transkription ist. Um diese Frage zu klären, wurde die an Chromatin synthetisierte RNA an DNA Filter hybridisiert, die mit einem Überschuß unmarkierter in vivo 5S RNA aus Rattenleber vorhybridisiert worden waren. Mit diesen DNA-Filtern können dann selektiv Transkripte vom nichtcodogenen Strang der 5S DNA erfaßt werden. Eine Aussage über die Transkripte vom nichtcodogenen Strang konnte mit der bisher verwendeten Kompetitionshybridisierung nicht gemacht werden. Sie wird bei Verwendung vorhybridisierter Filter dadurch möglich, daß Kompetition und Haupthybridisierung zeitlich voneinander getrennt sind und die Anti-5S RNA infolge des Fehlens von Kompetitor-RNA bei der Haupthybridisierung nicht mehr durch RNA-RNA-Hybridisierung dem Nachweis entzogen werden kann.
Tabelle 6 zeigt das Ergebnis eines Versuchs, in dem die RNA,

die an Chromatin mit endogenen und exogenen Polymerasen aus HeLa-Zellen und E. coli synthetisiert worden war, durch Hybridisierung an normale und an vorhybridisierte Filter analysiert wurde.

RNA Polymerase exogen	Einheiten	gesamte ^{3}H-RNA (cpm)	hybridisierte ^{3}H-RNA (cpm) -5S	+5S	hybridis. ^{3}H-RNA exogen-endogen (cpm) -5S	+5S	Anticodogene Transkripte %
-	-	44170	704	16	-	-	2,2 %
HeLa(A+C)	6,0	76410	2234	59	1530	43	2,8 %
HeLa C	4,5	60862	1500	44	794	28	3,5 %
E.coli	6,0	137870	912	141	208	125	60 %

Tab.6:
Hybridisierung von in vitro an HeLa-Chromatin synthetisierter ^{3}H-RNA an normale 5S DNA-Filter und DNA-Filter, die mit unmarkierter in vivo 5S RNA aus Rattenleber vorhybridisiert worden waren (40 µg/Filter = 200facher Überschuß). RNA-Synthese, Extraktion und Hybridisierung wurden wie bei "Methoden" beschrieben durchgeführt. Es wurde in vitro RNA untersucht, die durch die endogenen Polymerasen und exogene Polymerase C (Enzym A-haltig), C (rein) und E. coli Polymerase synthetisiert worden war. Für die endogene Synthese wurde ein Mock-Wert angesetzt, um die Vollständigkeit der Prähybridisierung zu überprüfen. Nach Vorhybridisierung betrug die Hybridisierungseffizienz für 5S RNA noch 0,88%. Dieser Korrekturfaktor ist in den Werten der Tabelle nicht berücksichtigt. Die Effizienz bei Verwendung der normalen Filter lag bei 25%, die Effizienz für die Hybridisierung von Anti-5S RNA-Sequenzen konnte nicht bestimmt werden.

Aus der Tabelle wird deutlich, daß sowohl die durch die endogene Polymerase C als auch die durch die beiden exogenen homologen Polymerasen synthetisierte RNA keine wesentlichen Mengen von Anti-5S RNA enthalten. Subtrahiert man die endogene Synthese von der mit exogenen Polymerasen, so daß die exogene Synthese getrennt erfaßt wird, läßt sich errechnen,

daß der Prozentsatz von Anti-5S RNA im Vergleich zur endogenen Synthese mit exogener homologer Polymerase nicht ansteigt (2-3%). Für die endogene Synthese ergab sich ein ähnliches Ergebnis auch durch kompetitive Hybridisierung, die hier nicht näher beschrieben wird. Die Hybridisation ließ sich bis auf 4% herabsenken. Ein Unterschied zum Kernsystem bestand darin, daß in Kernen 0,9 ug 5S RNA nötig waren, um 50%ige Kompetition zu erreichen, während für RNA, die an Chromatin synthetisiert worden war, 0,12 ug ausreichten. Dieser Befund läßt sich durch den Verlust von endogener 5S RNA während der Chromatinpräparation erklären.
Ganz anders sieht das Ergebnis für die von E. coli Polymerase an Chromatin synthetisierte RNA aus. Es tritt eine wesentlich höhere Hybridisierung an prähybridisierte Filter ein. Sie liegt im Vergleich zur exogenen Polymerase C ca. 20fach höher. Die Prozentangaben in der letzten Spalte können allerdings nicht absolut genommen werden, da die Hybridisierungseffizienz für Anti-5S RNA höher ist als die für 5S RNA und nicht berechnet werden kann.
E. coli Polymerase transkribiert die 5S RNA-Gene in HeLa-Chromatin also symmetrisch, während die homologen endogenen und exogenen Polymerasen fast völlig asymmetrisch transkribieren.

3.3.2.4. Titration von HeLa-Chromatin mit exogener Polymerase C

Es war schon erwähnt worden, (3.3.2.2.), daß die 5S RNA-Gene in HeLa-Chromatin durch relativ geringe Konzentrationen exogener Polymerase C gesättigt werden können. Um dies genauer zu untersuchen, wurde eine Titration des Chromatins mit HeLa-Polymerase C (nicht in C_1 und C_2 aufgetrennt) durchgeführt.
Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Tabelle 7 und Abbildung 16 dargestellt.

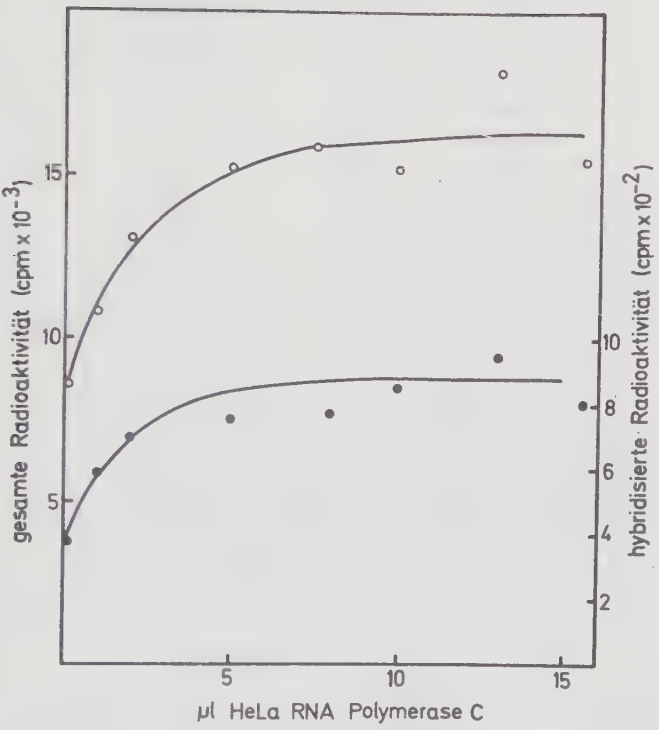


Abb.16:
Titration von HeLa-Chromatin mit exogener HeLa-Polymerase C. Für eine äquivalente Kernmenge von 0,62 x 10^6 wurden die angegebenen Mengen exogener Polymerase eingesetzt. Gesamte RNA-Synthese und hybridisierbare RNA wurden für eine äquivalente Kernmenge von 0,5 x 10^6 bestimmt. 10 µl exogene Polymerase entsprechen 25 Einheiten.
(o) Gesamte Radioaktivität, gleichzeitig die zur Hybridisierung eingesetzte Radioaktivität
(•) An 5S DNA hybridisierte Radioaktivität

HeLa-Polymerase C (µl)	Einheiten	gesamte ^{3}H-RNA (cpm)	hybridisierte ^{3}H-5SRNA (cpm)	korrigierte Hybridwerte für 5SRNA (cpm)	% ^{3}H-5SRNA
0	-	8615	210	381	4,42
1	2,5	10830	326	592	5,46
2	5,0	13100	385	700	5,34
5	12,5	15333	417	758	4,94
7,5	18,76	15930	423	769	4,82
10,0	25,0	15205	467	849	5,52
13,0	32,54	18180	522	949	5,22
15,6	39,06	15470	441	801	5,17

Tab. 7:
Titration von HeLa-Chromatin mit exogener HeLa-Polymerase C. Chromatin (äquivalente Kernmenge von 0,62 x 10^6) wurde mit den angegebenen Mengen exogener HeLa-Polymerase C wie unter Methoden beschrieben inkubiert. Die RNA wurde extrahiert. Für eine äquivalente Kernmenge von 0,5 x 10^6 wurde die Gesamtsynthese und die hybridisierbare RNA bestimmt. Die spezifische Aktivität betrug 6546 cpm/pmol und die Hybridisierungseffizienz 55%.

Die Synthese von 5S RNA ließ sich mit exogener, gereinigter HeLa-Polymerase C maximal auf das 2-2,5fache steigern. Dies wurde auch durch alle anderen Versuche bestätigt. Dabei wurde für eine äquivalente Kernmenge von 0,62 x 10^6 im Ansatz mit ca. 18 Einheiten Polymerase eine Sättigung erreicht. Subtrahiert man von allen Zahlenwerten der Ansätze bis 18,7 Einheiten Polymerase C die endogene Synthese, läßt sich die allein auf exogenes Enzym C zurückgehende RNA-Synthese ablesen.

Einheiten Polymerase C (E)	gesamte ^{3}H-RNA (cpm)	hybridisierte ^{3}H-5S RNA (cpm)	% ^{3}H-5S RNA
2,5	2215	211	9,5
5,0	4485	319	7,1
12,5	6618	377	5,7
18,76	7315	388	5,1

Der Prozentsatz der 5S RNA-Synthese sank mit zunehmender Konzentration der exogenen Polymerase zugunsten der tRNA-Synthese von 9,5%, auf 5,1%. Das könnte auf eine größere Affinität der Polymerase C zu den 5S RNA-Genen unter den verwendeten Inkubationsbedingungen hinweisen.

3.3.3. Vergleichende Transkription von HeLa-Chromatin mit den gereinigten RNA-Polymerasen A, B und C aus HeLa-Zellen, Rattenleberkernen und Ascites-Zellen und mit E. coli-Polymerase.

Durch die bisherigen Versuche konnte gezeigt werden, daß exogene homologe Polymerase C die 5S RNA-Gene in HeLa-Chromatin korrekt transkribiert, während E. coli Polymerase die Gene willkürlich abliest. Es stellte sich die Frage, ob die beobachtete Stimulierung der 5S RNA-Synthese spezifisch für die HeLa-Polymerase C war oder ob auch die Polymerasen C aus heterologen, aber eukaryonten Organismen die gleiche Spezifität zeigen. Da diese Polymerasen der HeLa-Polymerase C im Gegensatz zu E. coli Polymerase strukturell sehr nahe stehen, ist diese Möglichkeit nicht auszuschließen. Außerdem mußte untersucht werden, ob die gereinigten Polymerasen A und B zur 5S RNA-Synthese in vitro beitrugen. Für HeLa-Polymerase A als Komponente des wenig gereinigten Enzyms C war in dieser Hinsicht zwar schon ein negatives Ergebnis erhalten worden. Dies kann jedoch nicht einfach auf das gereinigte Enzym A übertragen werden.
In zwei Parallelversuchen mit den Polymerasen A, B und C aus HeLa-Zellen und Rattenleber, Polymerase A und C aus Ascites-

RNA-Polymerase exogen	Enzym-einheiten	α-Amanitin (µg/ml)	gesamte RNA-Synthese (cpm)	hybridisierte 5S RNA (cpm)	% 5S RNA
-	-	-	139 970	4594	3,3
-	-	0,5	119 850	4087	3,4
HeLa A	43,6	0,5	108 570	3080	2,8
HeLa B	35,8	-	114 935	3304	2,9
HeLa C	39,0	0,5	128 950	7927	6,1
HeLa C_2	6,4	0,5	119 540	5400	4,5
Rattenleber A	9,6	0,5	128 720	4340	3,0
Rattenleber B	82,6	-	117 985	3830	3,0
Rattenleber C	8,4	0,5	120 560	3500	2,9
E. coli	10,0	0,5	303 183	7725	2,5
-	-	0,5	55 410	2613	4,7
HeLa C	39,0	0,5	79 210	5866	7,4
Ascites A	39,6	0,5	59 040	1966	3,3
Ascites C	9,6	0,5	67 550	2012	3,0

Tab.8:

RNA-Synthese an isoliertem HeLa-Chromatin mit homologen und heterologen RNA-Polymerasen. Die RNA-Synthese wurde wie unter "Methoden" beschrieben ausgeführt. Die Hybridwerte sind bereits auf 100% Hybridisierungseffizienz umgerechnet worden. Die Effizienz betrug 45-50%. Die spezifische Aktivität im Ansatz lag bei 11086 cpm/pmol.
In der Tabelle sind zwei Versuche zusammengefaßt. Die äquivalente Kernmenge im Ansatz betrug $1,59 \times 10^6$ (oben) bzw. $1,24 \times 10^6$ (unten). Die gesamte RNA-Synthese und Hybridisierung wurde für $1,27 \times 10^6$ bzw. $1,0 \times 10^6$ bestimmt.

Zellen und E. coli Polymerase wurde untersucht, welchen Effekt diese Polymerasen auf die 5S RNA-Synthese haben. Da einige der verwendeten Polymerasen nur in einer im Vergleich zu HeLa-Polymerase C relativ niedrigen Aktivität (wegen der Ammoniumsulfatkonzentration) eingesetzt werden konnten, war zusätzlich ein Ansatz mit HeLa-Polymerase C_2 mitgetestet worden, die eine ähnlich niedrige Aktivität aufwies.
Aus den Werten in Tabelle 8, die das Ergebnis dieses Versuchs wiedergibt, läßt sich ablesen, daß außer HeLa-Polymerase C (und C_2) und E. coli Polymerase keine der untersuchten Polymerasen in der Lage war, die 5S RNA-Synthese zu steigern. Dieses Ergebnis wurde in mehreren ähnlich konzipierten Versuchen bestätigt.

3.4. Transkription von gereinigter hochmolekularer HeLa-DNA mit HeLa-Polymerase A und C und mit E. coli Polymerase

Von zwei Arbeitsgruppen war beschrieben worden, daß Hefe-Polymerase A in der Lage war, die Gene für 45S RNA von proteinfreier Hefe-DNA präferentiell zu transkribieren (van Keulen et al., 1975; Holland et al., 1977). Deshalb sollte untersucht werden, ob sich ein ähnliches Resultat auch für HeLa-Polymerase C und die 5S RNA ergeben würde.
Bei der Isolierung der HeLa-DNA wurde nach einer Methode verfahren, die hochmolekulare DNA mit sehr wenig Einzelstrangbrüchen lieferte. Dies war wichtig, da RNA-Polymerase in der Lage ist, an Einzelstrangbrüchen die RNA-Synthese unspezifisch zu initiieren (Flint et al., 1974; Hecht und Birnstiel, 1972). Wegen des zu erwartenden niedrigen Prozentsatzes an in vitro 5S RNA wurde mit ^{32}P-UTP sehr hohes spezifischer Radioaktivität als radioaktivem Precursor und mit einer geringeren UTP-Konzentration (20 µM) gearbeitet. Die DNA-Konzentration im Ansatz betrug 15 µg/ml.
Aus Tabelle 9 kann man entnehmen, daß alle 3 Polymerasen die HeLa-DNA sehr effektiv transkribierten. Jedoch betrug der Anteil der in vitro durch die HeLa-Polymerase C synthetisierten 5S RNA nur ca. 0,3% der gesamten RNA. Das lag ca. 150fach über dem Betrag, der bei einer gleichmäßigen Transkription

der gesamten HeLa-DNA zu erwarten wäre, da der Anteil der 5S DNA-Sequenzen an der HeLa-DNA ca. 0,001-0,002% beträgt. Gleichzeitig lag dieser Wert von 0,3% jedoch weit unter dem, der mit exogener HeLa Polymerase C an Chromatin erreicht wird (9%) (vgl. 3.2.4.). Darüber hinaus lieferten auch die HeLa Polymerase A und die E. coli Polymerase das gleiche Ergebnis wie Polymerase C für die Transkription der 5S RNA-Gene.

Zusätzlich wurde die in vitro RNA an 45S rRNA hybridisiert, da dadurch ein spezifisches Nachweisverfahren für die Polymerase A-Produkte gegeben war. Auch in diesem Fall zeigte sich für die beiden HeLa-Polymerasen ein ähnliches Ergebnis.

Die hybridisierbaren RNA-Produkte (5S RNA und 45S RNA) machten zusammen nur einen sehr geringen Anteil der gesamten in vitro synthetisierten RNA aus (1,5-2,0%), die übrige RNA stammte von anderen DNA-Regionen. Fraktionierte man die durch die 3 verschiedenen RNA-Polymerasen in vitro synthetisierte RNA auf Sephadex G 100, so zeigte sich ein Unterschied in der Größenverteilung. Während die durch Polymerase A synthetisierte RNA ausschließlich im hochmolekularen Bereich der Chromatographie eluierte (>6S), enthielt die durch Polymerase C synthetisierte RNA zu 50% auch RNA im Bereich 6S-3S. Die Transkripte der E. coli Polymerase lagen in der Größe zwischen denen der beiden anderen Polymerasen. Hybridisierung der Fraktionen an 5S und 45S DNA erbrachte trotz wiederholter Versuche mit verschiedenen Filtern keine hybridisierbaren Sequenzen.

RNA Polymerase	Einheiten	gesamte ^{3}H-RNA (^{32}P-cpm 200 µl)	Hybridisierte ^{32}P RNA/50µl (cpm) 5S	45S	% ^{32}P-5S RNA	% ^{32}P-45S RNA
HeLa-Polymerase A	19,6	1.380.400	1045	5213	0,30	1,58
HeLa-Polymerase C	14,4	1.753.100	1288	4990	0,29	1,12
E. coli Polymerase	10	30.591.400	14600	18600	0,19	0,24

Tab.9:
HeLa-DNA (15 µg/ml) wurde in 60 µl Gesamtvolumen wie unter "Methoden" beschrieben für 20 Minuten bei 25°C inkubiert. Als RNA-Polymerasen wurden zugesetzt: HeLa-Polymerase A und C und E. coli Polymerase in den angegebenen Konzentrationen. Die spezifische Aktivität im Ansatz betrug 183000 cpm ^{32}P-UTP/pmol. Die in vitro synthetisierte RNA wurde extrahiert und nach Äthanolfällung in 200 µl 0,5% SDS aufgenommen. 10 µl Aliquots wurden zur Messung des gesamten Einbaus an ^{32}P-UMP verwendet und je 50 µl wurden gegen 5S DNA und 45S DNA hybridisiert (12 Stunden). Die Hybridisierungseffizienz wurde nicht bestimmt.

4. Diskussion

RNA-Polymerase C wurde bislang in allen untersuchten Eukaryonten nachgewiesen (Seifart et al., 1972; Seifart und Benecke, 1975; Austoker et al., 1974; Weil und Blatti, 1976; Amalric, et al., 1972; Wilhelm et al., 1974). Dabei war fast immer das Vorkommen von zwei Unterformen beobachtet worden (Schwartz et al., 1974; Weinmann et al., 1974; Weinmann und Roeder, 1974), die sich lediglich in einer der kleinen der insgesamt 10 Untereinheiten unterschieden (Sklar und Roeder, 1976).

Einen ersten Anhalt bezüglich der Funktion dieser Polymerase lieferten Untersuchungen von Price und Penman (1972b). Diese Autoren berichteten, daß eine zytoplasmatische Polymerase, die einige Eigenschaften der Polymerase C aufwies, in isolierten Kernen von KB-Zellen die Synthese von 5S RNA und prä-tRNA katalysierte. Durch den Befund, daß Polymerase C durch hohe α-Amanitinkonzentrationen gehemmt und dadurch von den anderen Polymerasen abgegrenzt werden kann (Seifart et al., 1972), ließ sich dies auch schlüssig demonstrieren. Außerdem transkribiert eukaryonte Polymerase C in Adenovirus 2-infizierten KB-Zellen im späten Stadium der Infektion die Gene für drei viruscodierte niedermolekulare RNA-Spezies, von denen die 5,5S RNA (auch VA-RNA oder V_{156} genannt), mengenmäßig die wichtigste ist (Price und Penman,1972b; Weinmann et al., 1974). In weit geringerem Umfang werden die beiden RNA-Spezies mit Längen von 140 und 200 Nucleotiden synthetisiert (Weinmann et al., 1976).
Die Funktion der drei viralen RNAs, die nicht für Proteine codieren, ist nicht bekannt. V_{200} scheint ein Vorläufer von V_{156} zu sein, da sie alle Sequenzen dieser RNA enthält und am 3'-Ende zusätzlich ca. 30 Nucleotide (Harris und Roeder, 1978). Auch von tRNA ist für alle Eukaryonten ein 15 Nucleotide längerer Vorläufer, die prä-tRNA bekannt. Für 5S RNA wurde in hitzebehandelten Xenopus-Oocyten und Kulturzellen aus Drosophila gleichfalls ein 15 Nucleotide längeres Primärtranskript nachgewiesen (Denis und Wegnez, 1973; Rubin und Hogness, Rubin und Hogness, 1975), während nach allen bisherigen Erkenntnissen die reife 120 Nucleotide lange 5S RNA in HeLa-

Zellen auch das Primärtranskript darstellt. Polymerase C scheint also generell für die Synthese niedermolekularer, nicht informativer RNA-Spezies bzw. ihrer Vorläufer verantwortlich zu sein.

Um die Faktoren, die bei der Transkription der Gene für diese RNAs durch die eukaryonte Polymerase C eine Rolle spielen und die Spezifität des Vorgangs bedingen, genauer untersuchen zu können, ist die Entwicklung eines in vitro Systems, in dem die zu untersuchenden Gene über längere Zeit exprimiert werden, unumgänglich. Nur in in vitro Systemen ist es möglich, die Versuchsbedingungen zu kontrollieren und nach Wunsch zu beeinflussen. Kennzeichnend für eine spezifische Genexpression durch die entsprechenden Polymerasen ist die asymmetrische Transkription und das Erkennen bestimmter, für die betreffenden Gene charakteristischer Initiation- und Terminationsstellen, die nur auf dem codogenen DNA-Strang lokalisiert sind. An in vitro Transkriptionssysteme muß folglich die Forderung gestellt werden, daß die beteiligte RNA-Polymerase in der Lage ist, die RNA-Synthese zu reinitiieren. Von allen drei Polymerasen entspricht zur Zeit allein Polymerase C dieser Voraussetzung.

Für Polymerase C war von mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander das Vorkommen wiederholter Initiation in vitro beschrieben worden (Price und Penman, 1972b; Weinmann et al., 1976; McReynolds und Penman, 1974; Marzluff et al., 1974; Marzluff und Huang, 1975; Udvardy und Seifart, 1976). Die meisten dieser Untersuchungen basierten lediglich auf Größenanalysen der in vitro RNA. Da nicht ausgeschlossen werden kann, daß RNAs gleicher Größe aber unbekannten Ursprungs die korrekten Transkripte der 5S RNA und tRNA-Gene verunreinigen, ist die Interpretation solcher Versuche nicht immer stichhaltig. Die bis dato einzigen Untersuchungen an isolierten Kernen und Chromatin (Marzluff et al., 1974; Marzluff und Huang, 1975), in denen in vitro synthetisierte RNA an tRNA- und 5S RNA-Gene hybridisiert wurde, litten damals unter der nur geringen Menge an zur Verfügung stehender DNA, was äußerst niedrige Hybridisierungseffizienzen zur Folge hatte. Überdies waren die Synthesebedingungen in allen vor-

genannten Arbeiten nicht für die zu untersuchenden RNA-Spezies optimiert. Dadurch, daß uns Plasmide, die die Gene für Xenopus-5S RNA trugen, zur Verfügung standen, konnten wir 5S DNA in großem Maßstab zu isolieren und für Hybridisierungen im DNA-Überschuß einzusetzen, was die Erfassung aller in vitro synthetisierten 5S RNA-Sequenzen trotz des hohen Spiegels an endogener 5S RNA gewährleistete. Mit dieser Hybridisierungstechnik im DNA-Überschuß konnte gezeigt werden, daß unter optimierten Bedingungen die 5S RNA-Synthese durch die endogene Polymerase C sowohl in isolierten HeLa-Kernen als auch im Chromatin über einen längeren Zeitraum erhalten blieb; dabei fand eine ständige Reinitiation durch die endogene Polymerase C statt.

Einen ersten Hinweis auf Reinitiation der 5S RNA-Synthese in unserem System gab die langandauernde Kinetik und die extreme Empfindlichkeit der 5S RNA-Synthese gegenüber höheren Salzkonzentrationen. Daten von Cox (1976) für endogene Polymerase B und von Solage un Cedar (1976) für E. coli Polymerase an Hühnerchromatin gaben die Elongationsraten der Polymerasen mit 40-100 Nucleotiden pro Minute an. Nimmt man an, daß die Elongationsrate für Polymerase C in der gleichen Größenordnung liegt, müßte die 5S RNA-Synthese bei fehlender Reinitiation nach ca. 5 Minuten zum Erliegen kommen. Stattdessen wurde in den eigenen Versuchen sowohl in Kernen als auch in Chromatin während der 50-minütigen Inkubation ein kontinuierlicher Anstieg der in vitro synthetisierten RNA beobachtet.

Der eindeutige Beweis für Reinitiation wurde durch die Quantitierung der 5S RNA-Synthese auf der Basis der Hybridisierungsdaten erbracht. Für das Kernsystem ließ sich eine Zahl von 10500 bzw. 17700 in vitro synthetisierten 5S RNA-Molekülen pro Kern in 20 bzw. 40 Minuten errechnen. Analog dazu wurden in isoliertem Chromatin 3700 bzw. 7300 5S RNA-Moleküle in 20 bzw. 50 Minuten synthetisiert.

Diese Zahl ist nun zu der Zahl der 5S RNA-Gene in Beziehung zu setzen. Die in der Literatur vorhandenen Angaben zur Zahl der 5S RNA- und tRNA-Gene variieren beträchtlich. 1971 schätzten Hatlen und Attardi die Zahl auf 2000 5S RNA-Gene pro

haploidem HeLa-Genom. Quincey und Wilson (1969) gaben die Zahl der 5S und tRNA-Gene pro Rattenleberkern mit 1660 und 13000 an. Marzluff et al. (1975) dagegen errechneten für Maus-Myeloma-Zellen 400 5S RNA- und 4500 tRNA-Gene für das haploide Genom. Für die folgenden Ausführungen soll eine Zahl von 500 RNA-Genen für das haploide HeLa-Genom zugrunde gelegt werden. Wie viele Tumorzellen sind HeLa-Zellen heteroploid; statt der üblichen 46 Chromosomen menschlicher Zellen besitzen sie 70-80 Chromosomen. Die 5S RNA-Gene liegen in "Clustern" auf jedem dieser Chromosomen,was eine Zahl von 1500-1700 5S RNA-Genen pro HeLa-Kern ergibt.
In Verbindung mit den obigen Quantitierungsdaten ließ sich folglich eine durchschnittliche maximale Reinitiationsrate von 12 pro 5S RNA-Gen in isolierten Kernen errechnen; für Chromatin lag diese Rate deutlich erniedrigt bei 5 pro 5S RNA-Gen in 50 Minuten. In 20 Minuten wurden entsprechend Reinitiationsraten von 7 bzw. 2 für Kerne bzw. Chromatin erreicht.
Inkubation von Chromatin in Gegenwart von Heparin, einem Hemmer der Reinitiation, zeigte einen deutlichen Abfall der in vitro synthetisierten 5S RNA und bezeugte noch einmal eindrucksvoll die Reinitiation der 5S RNA-Synthese. Da ein 5S RNA-Gen wegen der geringen Länge nur ein elongierendes Polymerase C-Molekül zur Zeit aufnehmen kann, gestatteten die Daten dieses Experiments gleichzeitig, aus der Zahl der 5S RNA-Moleküle, die noch in Gegenwart von Heparin fertiggestellt werden, die Zahl der 5S RNA-Gene abzuschätzen, die im isolierten Chromatin von bereits initiierten Polymerase-C-Molekülen besetzt waren. Diese Berechnung ergab einen Wert von 1100-1600, was einem sehr großen Teil der 5S RNA-Gene entspricht. In Parallelansätzen ohne Heparin wurden zusätzlich ca. 3000 5S RNA-Moleküle synthetisiert, was eine Reinitiationsrate von 2-3 ergibt und gut mit den unabhängig gewonnenen Quantitierungsdaten für Chromatin übereinstimmt.
Die erhaltenen Reinitiationsraten für die 5S RNA-Synthese in HeLa-Kernen und Chromatin lagen in der gleichen Größenordnung wie die, die Marzluff et al. (1974) und Marzluff und Huang (1975) für die 5S RNA und tRNA-Synthese in Maus-Myeloma-

Kernen und Chromatin fanden (Kerne: 2-10fach; Chromatin: 1-5fach).
Mehrere Anzeichen deuten darauf hin, daß die gegenüber Kernen auf ca. 50-30% erniedrigte Reinitiationsrate in Chromatin hauptsächlich durch ein Defizit an Polymerase C in isoliertem Chromatin bedingt wird. Weinmann et al. (1976) und Sklar und Roeder (1976) geben die Zahl der Polymerase C-Moleküle in KB- und MOPC-Zellen mit 2-3 x 10^4 pro Zelle an, wovon in isolierten Kernen noch gut ein Drittel erhalten bleibt. Eine Übertragung dieser Daten auf HeLa-Zellen kann sicher nur bedingt erfolgen, auch muß berücksichtigt werden, daß die für HeLa-Zellen zugrunde gelegte Zahl von 1500 5S RNA-Genen mit einem erheblichen Fehler behaftet sein kann. Es scheint jedoch zuzutreffen, daß in HeLa-Kernen die meisten 5S RNA-Gene noch ausreichend mit Polymerase C besetzt sind, während im Chromatin ein größeres Defizit durch Auswaschen der Polymerase C auftritt (Diercks-Ventling et al., 1978). Diese Beobachtung wurde gestützt durch Befunde, daß die 5S RNA-Synthese in isolierten HeLa-Kernen durch exogene HeLa-Polymerase C nicht oder nur unwesentlich stimuliert wurde (nicht im Ergebnisteil aufgeführt), während ein Zusatz von exogener Polymerase C zum Chromatin die 5S RNA-Synthese gerade soweit steigerte (2-3fach), daß das ursprüngliche Niveau des Kernsystems wieder erreicht wurde.
Auf Grund der effizienten Reinitiation der 5S RNA-Synthese in diesem System in vitro wurde es möglich, wirklich verläßliche Auskunft über die Spezifität der Transkription zu erhalten, d.h. über Strangauswahl und Größe von de novo synthetisierter 5S RNA. Zu Beginn der in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen existierten nur zwei Arbeiten zu Teilaspekten dieser Fragestellung, in denen mit der Hybridisierungstechnik gearbeitet worden war (Marzluff et al., 1974; Marzluff und Huang, 1975). Diese Autoren beschrieben die korrekte Synthese von 5S RNA in isolierten Kernen und Chromatin von Maus-Myeloma-Zellen und die Abwesenheit von anticodogenen Transkripten. Diese letzte Aussage gründeten sie auf Ergebnisse von Hybridisierungen der in vitro RNA an 5S DNA, die aus Xenopus laevis gereinigt und in ihre

beiden komplementären Stränge aufgetrennt worden war. Da jedoch schon bei der Hybridisierung an den codogenen DNA-Strang nur äußerst niedrige Hybridisierungswerte (35 cpm) erzielt wurden, konnte lediglich die Existenz sehr großer Beträge an Anti-5S RNA mit einiger Sicherheit ausgeschlossen werden. Auch wurden keine mit Hybridisierung kombinierten Größenanalysen durchgeführt, wodurch letztere für Transkriptionsstudien erst ihre Aussagekraft gewinnen.
In dieser Arbeit konnte mit den Methoden der Größenfraktionierung der in vitro synthetisierten RNA aus HeLa-Kernen und Chromatin in Verbindung mit Hybridisierung eindeutig gezeigt werden, daß sämtliche in vitro synthetisierten 5S RNA-Sequenzen exakt die Länge der reifen in vivo 5S RNA besaßen. Es ließen sich keine 5S RNA-Sequenzen in Größenbereichen außerhalb 5S nachweisen, die durch inkorrekte Initiation, zu frühe Termination oder durch Überlesen des Terminationspunkts zustande gekommen wären. Die durchgehend exakte Länge der in vitro synthetisierten 5S RNA deutete schon darauf hin, daß Transkripte vom anticodogenen Strang zumindest nicht in größeren Mengen zugegen sein konnten, da dies den unwahrscheinlichen Fall voraussetzt, daß die Größe der anticodogenen Transkripte exakt mit der von in vivo 5S RNA übereinstimmt. Das wäre nur denkbar, wenn Polymerase C die zum Terminationssignal komplementäre Sequenz als Initiationsstelle erkennt und außerdem korrekt an der zur Initiationsstelle komplementären Sequenz terminiert.

Diese Annahme bestätigte sich dann durch die Ergebnisse der kompetitiven Hybridisierung und der Hybridisierung an prähybridisierte Filter. Kompetierung von in vitro in Kernen und Chromatin synthetisierter 5S RNA mit zytoplasmatischer 5S RNA drängte die Hybridisierung fast völlig zurück. Dieses Ergebnis ließ zunächst nur die Aussage zu, daß ein großer Teil der in vitro 5S RNA-Sequenzen vom codogenen DNA-Strang synthetisiert wurde. Eine quantitative Aussage zum Anteil der anticodogenen Transkripte war auf diesem Wege nicht möglich, da diese Transkripte unter den Bedingungen der kompetitiven Hybridisierung durch RNA-RNA-Hybridisierung

mit der Kompetitor-RNA sich dem Nachweis entziehen können (Reeder, 1973). Der genaue Anteil von Anti-5S RNA (in den in vitro Transkripten von isoliertem Chromatin) konnte dann durch Hybridisierung an DNA-Filter bestimmt werden, die mit in vivo 5S RNA vorhybridisiert worden waren, da in diesem Fall die Gefahr der RNA-RNA-Hybridisierung stark herabgesetzt war. Mit diesem Verfahren ließen sich keine signifikanten Mengen von Anti-5S RNA in der an Chromatin durch endogene Polymerase C synthetisierten RNA nachweisen.

Weitere Bestätigung für korrekte Strangauswahl lieferte ein Vergleich der Oligonucleotidmuster nach Verdauung mit Ribonuclease T_1 von in vivo und in vitro in Kernen synthetisierter 5S RNA. Das Profil für die internen Oligonucleotide der beiden RNAs stimmte so gut überein, daß ein größerer Betrag an Transkripten vom anticodogenen DNA-Strang, der das Oligonucleotidmuster völlig verändert hätte, ausgeschlossen werden kann. Geringfügige Diskrepanzen im Elutionsprofil rührten von leichten Schwankungen bei der Termination her. Während die in vivo 5S RNA ausschließlich die 5'-terminale Sequenz $-CUU_{OH}$ trägt, wird in vitro synthetisierte HeLa-5S RNA zu einem geringeren Teil auch mit $-CUUU_{OH}$ und $-CUUUU_{OH}$ terminiert (Yamamoto und Seifart, 1978).
Der Befund, daß die endogene Polymerase C die Gene der ribosomalen 5S RNA zuverlässig transkribiert, ermöglicht den weitergehenden Schritt, auch gereinigte exogen zugesetzte Polymerasen bezüglich ihrer Fähigkeiten zur spezifischen Transkription der 5S RNA in diesem System zu überprüfen. Damit kann ein erster Schritt in Richtung auf das Fernziel aller Transkriptionsstudien gemacht werden: ein Transkriptionssystem, das vollständig aus bekannten Komponenten rekonstituiert worden ist und in dem der Einfluß einzelner Komponenten auf die Spezifität der Transkription analysiert werden kann.
In den vergangenen Jahren ist von nur wenigen Gruppen für diese Fragestellung homologe exogene Polymerasen eingesetzt worden (Steggles et al., 1975; Honjo und Reeder, 1974). Die überwiegende Zahl der Untersuchungen wurde mit E. coli

Polymerase als exogener Polymerase durchgeführt. In keinem der Fälle konnte trotz anfänglicher teilweise positiver Ergebnisse aus jetziger Sicht stichhaltig eine Spezifität der Transkription der entsprechenden Gene nachgewiesen werden. Deswegen sollte die E. coli Polymerase auf ihre Verwendbarkeit als exogene Polymerase für die Transkription der 5S RNA-Gene von HeLa-Chromatin untersucht werden.

Die bakterielle Polymerase vermochte zwar die Gesamtsynthese des HeLa-Chromatins schon bei niedriger Enzymkonzentration (0,8 Einheiten) um das Vierfache zu steigern, bewirkte jedoch keinen gleichzeitigen Anstieg in der Synthese der 5S RNA. Dieser Befund besagt, daß E. coli Polymerase keine ausgeprägte Affinität zu einer limitierten Anzahl von Genen, einschließlich der 5S RNA Gene besitzt, sondern unspezifisch den größten Teil der in Chromatin für die Transkription verfügbaren DNA (ca. 10%) zur RNA-Synthese verwenden muß. Da der Anteil der 5S RNA-Gensequenzen am gesamten Genom nur 0,001-0,002% betragen, ist bei diesen niedrigen Polymerasekonzentrationen rein rechnerisch keine meßbare Auswirkung auf die 5S RNA-Synthese zu erwarten. Erst bei Polymerasekonzentrationen, die einen 5-50fachen Anstieg der gesamten RNA-Synthese bewirkten, wurden auch vermehrt hybridisierbare 5S RNA-Sequenzen nachweisbar. Wie jedoch Größenanalyse dieser in vitro RNA auf Sephadex G 100 zeigte, waren diese zusätzlich durch E. coli Polymerase synthetisierten 5S RNA-Sequenzen sämtlichst in RNA-Ketten 6S enthalten. Zwar wurden auch im niedermolekularen Bereich RNA-Ketten sehr heterogenen Charakters synthetisiert; die im 5S Bereich hybridisierenden Sequenzen jedoch waren ausschließlich Produkte der endogenen Polymerase C.
E. coli Polymerase ist also nicht in der Lage, die richtigen Initiationsstellen der 5S RNA-Gene zu erkennen; sie katalysiert die Bildung hochmolekularer Produkte, die die Sequenzen des 5S RNA-Gens zufällig enthalten können. Außerdem zeigte E. coli Polymerase keine Selektivität bei der Strangauswahl, die das Ergebnis der Hybridisierung an vorhybridisierte 5S DNA-Filter zeigte. Es blieb eine Resthybridisierung

von ca. 50% erhalten, was für einen beträchtlichen Anteil von Transkripten des nichtcodogenen Strangs spricht.

Ähnliche Ergebnisse wurden gleichzeitig von Parker und Roeder (1977) erhalten, die fanden, daß die E. coli Polymerase beide DNA-Stränge in Xenopus laevis Chromatin mit der gleichen Effizienz transkribiert, die auch mit proteinfreier DNA beobachtet wird. Trotz gewisser struktureller Ähnlichkeiten zu den eukaryonten Polymerasen besitzt das Enzym aus Prokaryonten offenbar keine Erkennungsspezifität für eukaryonte Gene und es muß daher dringend von der Verwendung des E. coli-Enzyms für derartige Untersuchungen abgeraten werden.
Im Folgenden wurde untersucht, ob exogen zugesetzte, homologe RNA Polymerase C noch in der Lage ist, die entsprechenden Gene korrekt zu erkennen und zu transkribieren. Die Verwendung exogener gereinigter, homologer Polymerasen führt gegenüber den endogenen Polymerasen insofern einen neuen Aspekt ein, als die Polymerasen während des Isolierungs- und Reinigungsprozesses möglicherweise vorhandene Spezifitätsfaktoren verloren haben können. Deswegen wurde zunächst ein nur wenig gereinigtes HeLa-Enzym C als exogene Polymerase eingesetzt, das außerdem noch beträchtliche Mengen an Polymerase A enthielt. Durch steigende Mengen dieses Enzyms wurde sowohl die gesamte RNA-Synthese als auch die 5S RNA-Synthese merklich erhöht. Die vermehrte 5S RNA-Synthese ging dabei allein auf die Polymerase C-Komponente im exogenen Enzymgemisch zurück, wie durch Inkubation in Gegenwart von hohen α-Amanitinkonzentrationen gezeigt werden konnte. In diesen Ansätzen, in denen die Polymerase C total inhibiert ist, fiel der zuvor beobachtete Anstieg der 5S RNA Synthese aus. Die durch exogene Polymerase C zusätzlich synthetisierten 5S RNA-Ketten besaßen alle die korrekte Länge von 120 Nucleotiden. In weitergehenden Versuchen wurde auch für intensiver gereinigte Polymerase C, die frei von anderen RNA-Polymerasen war, ein ähnliches Ergebnis erhalten.

Damit ist erwiesen, daß die exogenen Polymerasen C unterschiedlichen Reinheitsgrades die Gene für ribosomale 5S RNA spezifisch transkribieren. Es konnte auch gezeigt werden,

daß die Transkription ausschließlich vom korrekten DNA-Strang erfolgte, da nach Hybridisierung der in vitro RNA an vorhybridisierte DNA-Filter fast keine Resthybridisierung meßbar war. Dieser positive Befund steht im Gegensatz zu den mit der E. coli Polymerase gefundenen Ergebnissen.

Wie durch Titration von HeLa-Chromatin mit gereinigter Polymerase C gezeigt werden konnte, wurde eine Sättigung der 5S RNA-Gene schon bei überraschend niedrigen Konzentrationen der exogenen Polymerase erreicht. Unabhängig von dem Ausgangsniveau der endogenen 5S RNA-Synthese wurde dabei maximal eine 2-3fache Steigerung der 5S RNA-Synthese beobachtet, was auch durch mehrere anders konzipierte Versuche gezeigt werden konnte. Wie schon erwähnt, wird durch die exogene Polymerase C vermutlich das während der Chromatinpräparation in diesem Transkriptionssystem entstandene Defizit an Polymerase wieder aufgefüllt. Dabei war mit steigender Polymerasekonzentration ein Absinken des Prozentsatzes der 5S RNA, die allein durch die exogene Polymerase C synthetisiert wurde, zu beobachten. Dies könnte darauf hinweisen, daß die Affinität der Polymerase C unter den angewendeten Inkubationsbedingungen zu den 5S RNA-Genen größer ist als zu den zahlenmäßig überwiegenden tRNA-Genen. Interessant war in diesem Zusammenhang ferner, daß Konzentrationen von exogener Polymerase C, die über dem Sättigungsniveau der 5S RNA-Gene lagen, nicht zu unspezifischer Transkription dieser Gene führten, wie aus den in Abb.15 dargestellten Ergebnissen deutlich wird..
Kürzlich veröffentlichte Befunde von Parker und Roeder (1977) konnten ebenfalls eine spezifische Transkription der 5S RNA-Gene durch homologe Polymerase III an Chromatin von Xenopus leavis Oocyten nachweisen. Diese Autoren erreichten eine wesentlich stärkere Stimulierung der 5S RNA-Synthese durch die exogene Polymerase (15-50fach), die dadurch zu erklären ist, daß die prävitellogeninen Oocyten, von denen ihr Chromatin stammte, ganz bevorzugt 5S RNA synthetisieren (40% der Gesamtsynthese) und daß die 5S RNA-Gene hochrepetetiv sind. Das haploide Genom enthält ca. 25000 5S RNA-Gene, was einer Zahl von 100000 Genen pro Kern entspricht, da die

Oocyten einen tetraploiden Chromosomensatz besitzen (Brown und Weber, 1968; Denis und Wegnez, 1973).
Sklar und Roeder (1977) berichteten außerdem, daß in isolierten Kernen von MOPC-Zellen die Polymerase C zusätzlich zu 5S RNA und tRNA erhebliche Mengen von RNA anderer Herkunft im Bereich von 8-10S transkribierte. Dieser Befund konnte in der vorliegenden Arbeit für HeLa-Kerne nicht bestätigt werden.
Die Beobachtung, daß Polymerase C in zwei chromatographisch trennbaren Unterformen C_1 und C_2 (Sklar und Roeder, 1976) existiert, läßt die Vermutung aufkommen, daß sie möglicherweise unterschiedliche Funktionen bei der Transkription ausüben könnten. Dabei bietet sich die Hypothese an, daß eine der beiden Unterformen 5S RNA und die zweite tRNA synthetisiert. Da es gelungen war, die beiden Unterformen der HeLa-Polymerase C voneinander zu trennen, konnte diese Fragestellung untersucht werden. Es stellte sich eindeutig heraus, daß zumindest für die 5S RNA-Synthese an HeLa-Chromatin keine Präferenz für eine der beiden Unterformen zu erkennen war. Da beide Unterformen in der Lage waren, auch die gesamte RNA-Synthese über das Niveau der 5S RNA-Synthese hinaus zu steigern, scheint auch keine Präferenz für die tRNA-Synthese gegeben zu sein. Das Sättigungsniveau der Polymerase C_2 für die Synthese von 5S RNA schien allerdings etwas niedriger zu liegen und bei niedrigeren Enzymkonzentrationen erreicht zu werden als für Polymerase C_1. Eine schlüssige Erklärung dafür kann zur Zeit nicht gegeben werden.
Ähnliche Ergebnisse erhielten Sklar und Roeder (1977) für isolierte MOCP-Kerne und Jaehning und Roeder (1977) für Adenovirus-infizierte KB-Kerne. In diesen Systemen erwiesen sich beide Polymerase C-Unterformen als gleichermaßen effektiv in der Stimulierung der 5S bzw. 5,5S RNA-Synthese.
Zwischen den Polymerasen C verschiedener Eukaryonten besteht im Gegensatz zu E. coli Polymerase eine sehr große strukturelle Übereinstimmung, wie Untersuchungen an MOPC-Zellen, KB-Zellen und Xenopus laevis gezeigt haben (Sklar et al., 1975; Jaehning et al., 1977). Aus diesem Grund drängt sich

die Frage auf, ob die Spezifität der Expression der 5S RNA-Gene in HeLa-Chromatin auf die homologe Polymerase C beschränkt ist oder ob auch eukaryonte Polymerasen C heterologer Herkunft die gleiche Spezifität zeigen.
Zur Klärung dieser Fragen wurden zusätzlich zu HeLa-Polymerase C auch die entsprechenden gereinigten Polymerasen aus Ascites-Zellen und Rattenleberkernen als exogene Polymerasen an HeLa-Chromatin eingesetzt. Darüber hinaus wurden die gereinigten Polymerase A und B dieser drei Zellarten hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die 5S RNA-Synthese an HeLa-Chromatin untersucht. Bei den Versuchen mit exogenem Polymerase A-haltigem Enzym C hatte sich zwar schon gezeigt, daß HeLa-Polymerase A die 5S RNA-Gene nicht transkribiert, dieses Ergebnis kann jedoch nicht ohne weiteres auf die gereinigte Polymerase A übertragen werden.
Es stellte sich heraus, daß bei den eingesetzten Enzymkonzentrationen außer HeLa-Polymerase C keine der anderen eukaryonten Polymerasen, insbesondere keine der heterologen Polymerasen C, irgendeinen meßbaren Einfluß auf die 5S RNA-Synthese ausübten. Dabei muß festgestellt werden, daß diese Enzyme auch keinen deutlichen Effekt auf die gesamte RNA-Synthese zeigten. Der Grund dafür könnte entweder in den Inkubationsbedingungen liegen oder in der relativ niedrigen Enzymkonzentration, die wegen der hohen Ammoniumsulfatkonzentration der Enzymlösungen nur eingesetzt werden konnten. Dagegen spricht, daß das als Kontrolle mitgeführte HeLa-Enzym C_2, das eine ähnlich niedrige Aktivität aufwies, die 5S RNA-Synthese merkbar stimulierte. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß bei wesentlich höheren Konzentrationen insbesondere der heterologen Polymerasen C eine Auswirkung auf die 5S RNA-Synthese - welcher Art auch immer - eintritt.
Auch Parker und Roeder (1977) beobachteten, daß die 5S RNA-Synthese in Xenopus laevis Oocyten-Chromatin durch die homologe Polymerase C stimuliert wurde, während MOPC-Polymerase II und Xenopus laevis Polymerase I keinen Effekt zeigten. Eine heterologe Polymerase C war von ihnen nicht geprüft worden.

In Abweichung zu den Ergebnissen für HeLa-Chromatin wurde für isolierte Kerne von MOPC-Zellen (Sklar und Roeder, 1977) und von Adenovirus 2-infizierten KB-Zellen (Jaehning und Roeder, 1977) berichtet, daß sowohl homologe Polymerase C als auch die heterologen Enzyme C aus Xenopus laevis bzw. MOPC-Zellen die Synthese von 5S RNA in gleichem Ausmaß spezifisch zu steigern vermochten. Zu gänzlich anderen Resultaten hinsichtlich dieser Fragestellung kamen 1974 Honjo und Reeder. Sie berichteten, daß die 5S RNA-Gene in Xenopus laevis-Chromatin durch homologe Polymerase I und II gleichermaßen unspezifisch transkribiert werden. In der in vitro RNA waren anticodogene sowie auch Spacersequenzen nachweisbar. Eine exogene Polymerase C war von ihnen nicht untersucht worden. Die Ursache für dieses abweichende Ergebnis könnte in der Verwendung von Mn^{2+} statt Mg^{2+} als Salz zu suchen sein. Mn^{2+} begünstigt in vitro eine unspezifische Initiation der RNA-Synthese (Holland et al., 1977; Yamamoto und Seifart, 1977).

Es hatte sich erwiesen, daß ein Transkriptionssystem aus isoliertem HeLa-Chromatin und gereinigter Polymerase C alle Regulationsfaktoren enthielt, die zur spezifischen Expression der 5S RNA-Gene benötigt werden. Um das Feld für die Suche nach Kontrollfaktoren der Transkription von zwei Seiten einzukreisen, wurde abschließend hochmolekulare, native HeLa-DNA mit den gereinigten HeLa-Polymerasen A und C sowie mit E. coli Polymerase transkribiert. In diesem System konnte für HeLa-Polymerase C keine spezifische Transkription der 5S RNA-Gene nachgewiesen werden; jede der drei geprüften Polymerasen transkribierte 5S RNA-Sequenzen im etwa gleichen Ausmaß. Der Anteil der 5S RNA-Sequenzen lag zwar 100-200fach höher als bei einer gleichmäßigen Transkription der gesamten DNA zu erwarten wäre, jedoch betrug er nur etwa 0,3% der gesamten in vitro synthetisierten RNA. Dies bedeutet, daß alle drei Polymerasen zum größten Teil RNA von anderen Regionen als von den 5S RNA-Genen transkribieren. Allerdings zeigte eine Analyse der in vitro RNA auf Sephadex G 100, daß sich die Produkte der drei Polymerasen in ihrer Länge

voneinander unterschieden. Dies könnte trotz fehlender Spezifität der Transkription eine unterschiedliche Affinität der Polymerasen zu verschiedenen Basensequenzen andeuten.
Analoge Untersuchungen von Parker und Roeder (1977) zur Transkription der 5S RNA von proteinfreier DNA aus Xenopus laevis-Erythrocyten ergaben mit obigen Daten übereinstimmende Befunde. Sie beobachteten auch, daß die Transkription mit allen getesteten Polymerasen symmetrisch erfolgte. Auch für die Transkription von 5,5S RNA von gereinigter Adenovirus 2-DNA mit KB-Zellen Polymerase III konnte keine Spezifität nachgewiesen werden (Jaehning et al., 1977), obwohl diese Gene in isolierten Kernen Adenovirus-infizierter KB-Zellen durch endogene (Weinmann et al., 1974,1975) und exogene Polymerase III (Jaehning und Roeder, 1977) auch KB-Zellen korrekt transkribiert werden.
Offensichtlich reichen eine proteinfreie DNA-Matrize und eine hochgereinigte Polymerase C nicht aus, um die Spezifität der 5S RNA-Transkription zu gewährleisten. Einige neuere Arbeiten von Brown und Gurdon (1977, 1978) und von Wu (1978) weisen darauf hin, daß es sich bei diesen zusätzlich notwendigen Faktoren nicht unbedingt um fest mit dem Chromatin assoziierte Faktoren handeln muß. Brown und Gurdon (1977) berichteten, daß isolierte proteinfreie 5S DNA aus Xenopus laevis Oocyten, die in Xenopus laevis Oocyten-Kerne von lebenden Oocyten injiziert wurde, von den endogenen Polymerasen als Matrize zur Synthese von 5S RNA verwendet wurde, wobei die Gene korrekt transkribiert wurden. Das gleiche Ergebnis erhielten sie bei Injektion von Plasmid-DNA (pMB9), die verschiedene einzelne 5S RNA-Gene mit dazugehörigem 5'-terminalen Spacer enthielten (Brown und Gurdon, 1978). Dabei ist es wichtig zu erwähnen, daß die Spacersequenzen der einzelnen 5S RNA-Gene von Xenopus unterschiedliche Längen und auch unterschiedliche Nucleotidsequenzen besitzen (Carroll und Brown, 1976). Jedes einzelne dieser 5S RNA-Gene samt Spacer war in der Lage, die 5S RNA-Synthese in Oocyten korrekt zu stimulieren. Folglich müssen die DNA-Sequenzen,

die benötigt werden für spezifische Initiation und Termination, in jeder dieser "repeating units" vorkommen. Wu (1978) konnte zeigen, daß Adenovirus 2-DNA als Matrize für die spezifische Transkription von 5,5S RNA benutzt wird, wenn sie mit dem postmitochondrialen zytoplasmatischen Überstand von KB-Zellen inkubiert wird, der bedingt durch die Isolationsmethode beträchtliche Mengen von Polymerase C enthielt. Man könnte also sagen, daß bei Verwendung einer extrem wenig gereinigten Polymerase C eine spezifische Transkription der 5S bzw. 5,5S RNA-Gene von nativer DNA möglich ist.

Zur korrekten Transkription der 5S RNA-Gene sind also neben einer intakten DNA-Matrize und einer gereinigten Polymerase C noch weitere Faktoren notwendig. Diese Faktoren sind anwesend, wenn Chromatin als Matrize eingesetzt wird, wie sich aus den Versuchen in der vorliegenden Arbeit ergibt. Alternativ scheinen aber auch Faktoren unbekannter Natur, die nicht fest mit dem Chromatin assoziiert sind, eine regulatorische Funktion ausüben zu können. Um einen genaueren Einblick in die Vorgänge zu gewinnen, die die Expression der 5S RNA-Gene regulieren, müßten sich zukünftige Untersuchungen auf die Isolierung und Charakterisierung dieser Faktoren konzentrieren.
Das beschriebene Modellsystem, d.h. die Transkription der ribosomalen 5S RNA stellt einen Spezialfall dar, und Schlußfolgerungen aus diesen Untersuchungen müssen nicht unbedingt auf andere Transkriptionssysteme übertragbar sein; dies trifft vor allem für stark regulierte und induzierbare Systeme zu. Dennoch war es mit diesem Modellsystem erstmals möglich, grundlegenden Einblick in Transkriptionssysteme eukaryonter Organismen zu erhalten. Die hier gewonnenen Erkenntnisse können möglicherweise gewinnbringend auf andere, die Synthese von mRNA einschließende Systeme angewendet werden.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit berichtet über Untersuchungen zur Spezifität der Transkription in vitro am Modellfall der ribosomalen 5S RNA, die von der RNA-Polymerase C synthetisiert wird.
Spezifische Transkription wird definiert als präferentielle, korrekte Initiation und Termination sowie korrekte Strangauswahl bei der RNA-Synthese durch die RNA-Polymerase. An ein in vitro Transkriptionssystem war deswegen die unbedingte Anforderung zu stellen, daß die Synthese der 5S RNA über längere Zeit und unter ständiger Reinitiation erhalten blieb. Es wurden deshalb zunächst Systeme entwickelt, die diese Voraussetzung erfüllen. Sie bestehen im wesentlichen aus isolierten Zellkernen der HeLa-Kulturzellen bzw. dem daraus hergestellten Chromatin. Die in vitro synthetisierten 5S RNA-Sequenzen wurden durch Hybridisierung an Plasmid-DNA, die die 5S RNA-Gene aus Xenopus mulleri integriert enthielt, nachgewiesen.
Mit diesen Transkriptionssystemen wurden die folgenden Ergebnisse erhalten:

1.) mit isolierten Kernen

Unter optimierten Synthesebedingungen wurde 5S RNA durch die endogene Polymerase C über einen Zeitraum von 40 Minuten synthetisiert. Die maximale durchschnittliche Reinitiationsrate pro 5S RNA-Gen betrug 12. Das in vitro gebildete hybridisierbare Produkt wies korrekte Länge auf (120 Nucleotide) und war ausschließlich vom codogenen DNA-Strang synthetisiert worden. Diese Befunde wurden erhalten durch Kombination der Hybridisierung der in vitro synthetisierten RNA mit Größenanalysen, Hybridisierung an prähybridisierte DNA-Filter und Oligonucleotidanalysen.

2.) in isoliertem Chromatin

Das HeLa-Chromatin, das durch Lysis der HeLa-Kerne im hypotonen Medium isoliert wurde, enthielt noch erhebliche Mengen endogener Polymerase C (ca. 30-50% der endogenen Polymerase C-Aktivität der isolierten Kerne). Die Synthese von 5S RNA

war über ca. 50 Minuten nachweisbar, wobei eine maximale durchschnittliche Reinitiationsrate von 2-3 erreicht wurde. Auch die endogene Polymerase C des isolierten Chromatins transkribierte die 5S RNA-Gene spezifisch.

3.) mit exogene, gereinigten RNA-Polymerasen an isoliertem HeLa-Chromatin

a.) Exogene homologe Polymerase C, sowie auch beide ihrer Unterformen, C_1 und C_2, waren in der Lage, die 5S RNA-Gene spezifisch zu transkribieren. Das hybridisierbare Produkt wies korrekte Länge auf und enthielt keine Transkripte vom nichtcodogenen DNA-Strang. Es war möglich, eine Sättigung der 5S RNA-Gene des Chromatins durch das exogene Enzym C zu erreichen, wobei maximal eine 2-3fache Steigerung der 5S RNA-Synthese über das endogene Niveau beobachtet wurde.

b.) Heterologe Polymerasen C (Ehrlich Ascites-Zellen, Rattenleber) sowie homologe und heterologe Polymerasen A und B (HeLa-Zellen, Ehrlich Ascites-Zellen, Rattenleber) zeigten in den hier eingesetzten Aktivitäten, die etwa im gleichen Größenbereich lagen wie die der HeLa-Polymerase C, keinen Effekt auf die Synthese von 5S RNA.

c.) E. coli Polymerase synthetisierte 5S RNA-Sequenzen enthaltende RNA von HeLa-Chromatin, jedoch völlig unspezifisch. Die zusätzlich hybridisierbaren Sequenzen waren durchgehend größer als 6S und enthielten zum großen Teil Transkripte vom nichtcodogenen DNA-Strang.

4.)mit proteinfreier HeLa-DNA

Die 5S RNA-Gene wurden von hochmolekularer, nativer HeLa-DNA durch die HeLa-Polymerase C nicht spezifisch transkribiert, obwohl unter diesen Bedingungen die Aktivität der Polymerase sehr hoch war. Nur ein sehr geringer Teil (0,3%) der in vitro synthetisierten RNA ließ sich an 5S DNA hybridisieren. Überdies erbrachte der Einsatz von HeLa-Polymerase A und von E. coli Polymerase Ergebnisse, die mit denen für HeLa-Polymerase C fast identisch waren; auch hier betrug der Anteil der 5S RNA-Sequenzen an der gesamten in vitro synthetisierten RNA ca. 0,3%. Die unspezifische Transkription

der 5S RNA Gene von nativer HeLa-DNA steht im Gegensatz zur spezifischen Transkription dieser Gene von HeLa-Chromatin.

Zusammenfassend läßt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit die Schlußfolgerung ziehen, daß die Spezifität der Transkription der HeLa-5S RNA-Gene in vitro vom Zusammenspiel zweier Faktoren abhängig ist:

vom Chromatin als Matrize
und von der homologen RNA-Polymerase C.

6. Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
Ci	Curie
CTP	Cytidintriphosphat
cpm	Impulse pro Minute
DEAE	Diäthylaminoäthyl-
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
POPOP	2,2'-p-Phenylen-bis-(4-methyl-5-phenyl-oxazol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNA	Ribonucleinsäure
hnRNA	heterogeneous nuclear RNA
mRNA	messenger RNA
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	transfer RNA
RNase	Ribonuclease
S	Sedimentationskonstante
rpm	Umdrehungen pro Minute
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UTP	Uridintriphosphat

7. Literaturverzeichnis

Amalric, F., M. Nicoloso und J.P. Zalta, 1972.
A Comparative Study of "Soluble" RNA Polymerase Activity of Zajdela Hepatoma Ascites Cells and Calf Thymus.
FEBS Lett. 22, 67-72

Austoker, J.L., T.J.C. Beebee, C.J. Chesterton und P.H.W. Butterworth, 1974. DNA-Dependent RNA Polymerase Activity of Chinese Hamster Kidney Cells Sensitive to High Concentrations of α-Amanitin.
Cell, 3, 227-234.

Axel, R., H. Cedar und G. Felsenfeld, 1973.
Synthesis of Globin Ribonucleic Acid from Duck-Reticulocyte Chromatin in vitro.
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2029-2032.

Bitter, G.A. und R.G. Roeder, 1978.
Transcription of Viral Genes by RNA Polymerase II in Nuclei Isolated from Adenovirus 2 Transformed Cells.
Biochemistry 17, 2198-2206

Blair, D.G., D.J.Sherratt, D.B.Clewell und D.R.Helinski, 1972.
Isolation of Supercoiled Colicinogenic Factor E_1 DNA Sensitive to Ribonuclease und Alkali.
Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 2518-2522.

Blatti, S.P., C.J. Ingles, T.J. Lindell, P.W. Morris, R.F. Weaver, F. Weinberg und W.J. Rutter, 1970.
Structure and Regulatory Properties of Eucaryotic RNA Polymerases.
Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology, 35, 649-658.

Brown, D.D. und J.B. Gurdon, 1977.
High-Fidelity Transcription of 5S DNA Injected into Xenopus Oocytes.
Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 2064-2068.

Brown, D.D. und J.B. Gurdon, 1978.
Cloned Single Repeating Units of 5S DNA Direct Accurate Transcription of 5S RNA when Injected into Xenopus Oocytes.
Proc.Nat. Acad. Sci. 75, 2849-2853.

Brown, D.D. und K. Sugimoto, 1973.
5S DNAs of Xenopus laevis and Xenopus mulleri: Evolution of a Gene Family.
J. Mol. Biol. 78, 397-415.

Brown, D.D. und C.S. Weber, 1968.
Gene Linkage by RNA-DNA Hybridization. I. Unique DNA Sequences Homologous to 4S RNA, 5S RNA and ribosomal RNA.
J. Mol. Biol. 34, 661-680

Burton, K., 1956.
A Study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation.
Biochem. J. 62, 315-323.

Carroll, D., und D.D. Brown, 1976
Repeating Units of Xenopus laevis Oocyte-Type 5S RNA Are Heterogeneous in Length.
Cell, 7. 467-475.

Cedar, H., 1975.
Transcription of DNA and Chromatin with Calf Thymus RNA Polymerase B in vitro.
J. Mol. Biol. 95, 257-269

Cedar, H. und G. Felsenfeld, 1973.
Transcription of Chromatin in vitro.
J. Mol. Biol. 77, 237-254.

Chauveau, J., Y. Moulé und C. Rouiller, 1956.
Isolation of Pure and Unaltered Liver Nuclei. Morphology and Biochemical Composition.
Exptl. Cell Res. 11, 317-321.

Clark R.J. und G. Felsenfeld, 1971.
Structure of Chromatin
Nature New Biology 229, 101-106.

Cox. R.F., 1976.
Quantitation of Elongating Form A and B Polymerases in Chick Oviduct Nuclei and Effects of Estradiol.
Cell, 7, 455-465.

Craig, L.C., 1967.
Techniques for the study of Peptides and Proteins by Dialysis and Diffusion.
in: Methods in Enzymology, Vol XI, 870-905, (Academic Press, New York/London).

Crouse G.F., E.J.B. Fodor und P. Doty, 1976.
In vitro Transcription of Chromatin in the Presence of a Mercurated Nucleotide.
Pros. Nat. Acad. Sci. 73, 1564-1567.

Dale R.M.K. und D.C. Ward, 1975.
Mercurated Polynucleotides: Ney Probes for Hybridization and Selective Polymer Fractionation.
Biochemistry 14, 2458-2469

Denis H. und M. Wegnez, 1973.
Recherches biochimiques sur l'oogenèse. 7. Synthèse et maturation du RNA 5S dans les petits oocytes de Xenopus laevis.
Biochimie, 55, 1137-1151.

Detke S., J.L. Stein und G.S. Stein, 1978.
Synthesis of Histone Messenger RNA by RNA Polymerase II in Nuclei from S Phase HeLa S_3 Cells.
Nucl. Acids. Res. 5, 1515-1528.

Diercks-Ventling, C.J. Stalder und J. Gautschi, 1978.
Characterization of Chick Liver Chromatin and Analysis of its in vitro Transcription Products.
Nucl. Acids. Res. 5, 2643-2656.

Flint, S.J., D.I. de Pomerai, C.J. Chesterton und P.H.W. Butterworth, 1974.
Template Specificity of Eucaryotic DNA-Dependent RNA Polymerases. Effect of DNA Structure and Integrity.
Eur. J. Biochem. 42, 567-579.

Giesecke, K., A.E. Sippel, M.C. Nguyen-Huu, B. Groner, N.E. Hynes, T. Wurtz und G. Schütz, 1977.
RNA-Dependent RNA Polymerase Activity - Implications for Chromatin Transcription Experiments.
Nucl. Acids. Res. 4, 3943-3958.

Gilmour R.S. und J. Paul, 1973.
Tissue-Specific Transcription of the Globin Gene in Isolated Chromatin.
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 3440-3442.

Gross-Bellard, M., P. Oudet und P. Chambon, 1973.
Isolation of High-Molecular-Weight DNA from Mammalian Cells.
Eur. J. Biochem. 36, 32-38.

Guerry, P., D.J. Le Blanc und S. Falkow, 1973.
General Method for the Isolation of Plasmid Deoxyribonucleic Acid.
J. Bacteriol. 116, 1064-1066.

Gussin, G.N., 1966.
Three Complementation Groups in Bacteriophage R 17.
J. Mol. Biol. 21, 435-453.

Harris, B. und R.G. Roeder, 1978.
Structural Relationship of Low Molecular Weight Viral RNAs Synthesized by RNA Polymerase III in Nuclei from Adenovirus 2-infected Cells.
J. Biol. Chem. 253, 4120-4227.

Hatlen, L.E., F. Amaldi und G. Attardi, 1969.
Oligonucleotide Pattern after Pancreatic Ribonuclease Digestion and the 3' and 5' Termini of 5S Ribonucleic Acid from HeLa Cells.
Biochemistry 8, 4989-5005.

Hatlen, L.E. und G. Attardi, 1971.
Proportion of the HeLa Cell Genome Complementary to Transfer RNA and 5S RNA.
J. Mol. Biol. 56, 535-553.

Hecht, R.M. und M.L. Birnstiel, 1972.
Integrity of the DNA Template, a Prerequisite for the Faithful Transcription of Xenopus rDNA in vitro.
Eur. J. Biochem. 29, 489-499.

Hershfield, U., H.W. Boyer, C. Yanofsky, M.A. Lovett und D.R. Helinski, 1974.
Plasmid Col E 1 as a Molecular Vehicle for Cloning and Amplification of DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 3455-3459.

Holland, M.J., G.L. Hager und W.J. Rutter, 1977.
Transcription of Yeast DNA by Homologous Polymerase I and II: Selective Transcription of Ribosomal Genes by RNA Polymerase I.
Biochemistry 16, 16-24.

Honjo, T. und R.H. Reeder, 1974.
Transcription of Xenopus Chromatin by Homologous Ribonuclei Acid Polymerases: Aberrant Synthesis of Ribosomal and 5S Ribonucleic Acid.
Biochemistry 13, 1896-1899.

Jacob, F. und J. Monod, 1961.
Genetic Regulatory Mechanism in the Synthesis of Proteins.
J. Mol. Biol. 3, 318-356.

Jaehning, J.A. und R.G. Roeder, 1977.
Transcription of Specific Adenovirus Genes in Isolated Nuclei by Exogenous RNA Polymerases.
J. Biol. Chem. 252, 8753-8761.

Jaehning, J.A., P.S. Woods und R.G. Roeder, 1977.
Purification, Properties and Subunit Structure of Deoxyribonucleic Acid-Dependent Ribonucleic Acid Polymerase III from Uninfected and Adenovirus 2-Infected KB Cells.
J. Biol. Chem. 252, 8762-8771.

Kedes, L. und M.L. Birnstiel, 1971.
Reiteration and Clustering of DNA Sequences Complementary to Histone Messenger RNA.
Nature New Biol. 230, 165-169.

Kedinger, C., F. Gissinger und P. Chambon, 1974.
Animal DNA-Dependent RNA Polymerases. Molecular Structures and Immunological Properties of Calf Thymus Enzyme A 1 and Calf Thymus and Rat Liver Enzymes B.
Eur. J. Biochem. 44, 421-436.

Kedinger, C., M. Gniazdowski, J.L. Mandel, F. Gissinger und P. Chambon, 1970.
α-Amanitin: A Specific Inhibitor of One of Two DNA-Dependent RNA Polymerase Activities from Calf Thymus.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 165-170.

Krebs, G. und P. Chambon, 1976.
Animal DNA-Dependent RNA Polymerases. Purification and Molecular Structure of Hen-Oviduct and Liver Class B RNA Polymerases
Eur. J. Biochem. 61, 51-55.

Lindell, T.J., F. Weinberg, P.W. Morris, R.G. Roeder und W.J. Rutter, 1970.
Specific Inhibition of Nuclear RNA Polymerase II by α-Amanitin.
Science 170, 447-449.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall, 1951
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Marushige, K. und J. Bonner, 1966.
Template Properties of Liver Chromatin.
J. Mol. Biol. 15, 160-174.

Marzluff, W.F. und R.C.C. Huang, 1975.
Chromatin Directed Transcription of 5S and tRNA Genes.
Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 1082-1086.

Marzluff, W.F., Jr., E.C. Murphy, Jr., R.C.C. Huang, 1974.
Transcription of the Genes for 5S Ribosomal RNA and Transfer RNA in Isolated Mouse Myeloma Cell Nuclei.
Biochemistry, 13, 3689-3696.

Marzluff, W.F., Jr., E.L. White, R. Benjamin und R.C.C. Huang 1975.
Low Molecular Weight RNA Species from Chromatin.
Biochemistry 14, 3715-3724.

McReynolds, L. und S. Penman, 1974.
A Polymerase Activity Forming 5S and Pre-4S RNA in Isolated HeLa Cell Nuclei.
Cell 1, 139-145.

Nguyen Huu, M.C., A.A. Sippel, N.E. Hynes, B. Groner und G. Schütz, 1978.
Preferential Transcription of the Ovalbumin Gene in Isolated Hen Oviduct Nuclei by RNA Polymerase B.
Proc. Nat. Acad. Sci. 75, 686-691.

Olins, A.L. und D.E. Olins, 1974.
Spheroid Chromatin Units.
Science 183, 330-332.

Orkin, S.H., 1978.
Fidelity of Globin Ribonucleic Acid Synthesis in vitro by Isolated Nuclei: Asymmetric Transcription.
Biochemistry 17, 487-492.

Parker, C.S. und R.G. Roeder, 1977.
Selective and accurate Transcription of the Xenopus laevis 5S RNA Genes in Isolated Chromatin by Purified RNA Polymerase III.
Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 44-48.

Paul, J. und R.S. Gilmour, 1966.
Template Activity of DNA is Restricted in Chromatin.
J. Mol. Biol. 16 242-244.

Paul, J. und R.S. Gilmour, 1968.
Organ-Specific Restriction of Transcription in Mammalian Chromatin.
J. Mol. Biol. 34, 305-316.

Pinder, J.C., D.Z. Staynov und W.B. Gratzer, 1974.
Electrophoresis of RNA in Formamide.
Biochemistry 13, 5373-5378.

Price, R. und S. Penman, 1972a.
Transcription of the Adenovirus Genome by an α-Amanitin-Sensitive Ribonucleic Acid Polymerase in HeLa Cells.
J. Virol. 9, 621-626.

Price, R. und S. Penman, 1972b.
A Distinct RNA Polymerase Activity, Synthesizing 5,5S, 5S and 4S RNA in Nuclei from Adenovirus 2-Infected HeLa Cells.
J. Mol. Biol. 70, 435-450.

Quincey, R.V. und S.H. Wilson, 1969.
The Utilization of Genes for Ribosomal RNA, 5S RNA and Transfer RNA in Liver of Adult Rats.
Proc. Nat. Acad. Sci. 64, 981-988.

Reeder, R.H., 1973.
Transcription of Chromatin by Bacterial RNA Polymerase.
J. Mol. Biol. 80, 229-241.

Reeder, R.H. Und D.D. Brown, 1970.
Transcription of the Ribosomal RNA Genes of an Amphibian by the RNA Polymerase of a Bacterium.
J. Mol. Biol. 51, 361.377.

Reeder, R.H. und R.G. Roeder, 1972.
Ribosomal RNA Synthesis in Isolated Nuclei.
J. Mol. Biol. 67, 433-441.

Reeder, R.H. und W.J. Rutter, 1970.
Specific Nucleolar and Nucleoplasmic RNA Polymerases.
Proc. Nat. Acad. Sci. 65, 675-682.

Rubin, G.M. und D.S. Hogness, 1975.
Effect of Heat Shock on the Synthesis of Low Molecular Weight RNAs in Drosophila: Accumulation of a Novel Form of 5S RNA.
Cell 6, 207-213.

Sarma, M.H., E.R. Feman, und C. Baglioni, 1976.
RNA Synthesis in Isolated HeLa Cell Nuclei.
Biochim. Biophys. Acta 418, 29-38.

Schwartz, L.B. und R.G. Roeder, 1974.
Purification and Subunit Structure of Deoxyribonucleic Acid-Dependent Ribonucleic Acid Polymerase I from Mouse Myeloma, MOPC 315.
J. Biol. Chem. 249, 5898-5906.

Schwartz, L.B. und R.G. Roeder, 1975.
Purification and Subunit Structure of Deoxyribonucleic Acid-Dependent Ribonucleic Acid Polymerase II from the Mouse Plasmacytoma MOPC 315.
J. Biol. Chem. 250, 3221-3228.

Schwartz, L.B., V.E.F. Sklar, J.A. Jaehning, R. Weinmann und R.G. Roeder, 1974.
Isolation and Partial Characterization of the Multiple Forms of Deoxyribonucleic Acid-Dependent Ribonucleic Acid Polymerase in the Mouse Plasmacytome, MOPC 315.
J. Biol. Chem. 249, 5889-5897.

Seifart, K.H., B.J. Benecke und P.P. Juhasz, 1972.
Multiple RNA Polymerase Spezies from Rat Liver Tissue: Possible Existence of a Cytoplasmic Enzyme.
Arch. Biochem. Biophys. 151, 519-532.

Seifart, K.H. und B.J. Benecke, 1975.
DNA-Dependent RNA Polymerase C. Occurence and Localisation in Various Animal Tissues.
Eur. J. Biochem. 53, 293-300.

Sklar, V.E.F. und R.G. Roeder, 1976.
Purification and Subunit Structure of Deoxyribonucleic-Acid-Dependent Ribonucleic Acid Polymerase III from the Mouse Plasmacytoma, MOPC 315.
J. Biol. Chem. 251, 1064-1073.

Sklar, V.E.F. und R.G. Roeder, 1977.
Transcription of Specific Genes in Isolated Nuclei by Exogenous RNA Polymerases.
Cell 10, 405-414.

Sklar, V.E.F., L.B. Schwartz und R.G. Roeder, 1975.
Distinct Molecular Structures of Nuclear Class I, II and III DNA-Dependent RNA Polymerases.
Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 348-352.

Smith, M.M. und R.C.C. Huang, 1976.
Transcription in vitro of Immunoglobulin Kappa Light Chain Genes in Isolated Mouse Myeloma Nuclei and chromatin.
Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 775-779.

Solage, A. und H. Cedar, 1976.
RNA Chain Elongation on a Chromatin Template.
Nucl. Acids Res. 3, 2223-2231.

Steggles, A.W., G.N. Wilson, J.A. Kantor, D.J. Picciano, A.K. Falvey und W.F. Anderson, 1975.
Cell-Free Transcription of Mammalian Chromatin: Transcription of Globin Messenger RNA Sequences from Bone-Marrow Chromatin with Mammalian RNA Polymerases.
Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 1219-1223.

Stein, G., W. Park, C. Thrall, R. Maus und J. Stein, 1975.
Regulation of Cell Cycle Stage-Specific Transcription of Histone Genes from Chromatin by Non-Histone Chromosomal Proteins.
Nature, 257, 764-767.

Suzuki, Y. und D.D. Brown, 1972.
Isolation and Identification of the Messenger RNA for Silk Fibroin from Bombyx mori.
J. Mol. Biol. 63, 409-429.

Suzuki, Y. und P.E. Giza, 1976.
Accentuated Expression of Silk Fibroin Genes in vivo and in vitro.
J. Mol. Biol. 107, 183-206.

Towle, H.C., M. J. Tsai, S.Y. Tsai und B.W. O'Malley, 1977.
Effect of Estrogen on Gene Expression in the Chick Oviduct. Preferential Initiation and Asymmetric Transcription of Specific Chromatin Genes.
J. Biol. Chem. 252, 2396-2404.

Udvardy, A. und K.H. Seifart, 1976.
Transcription of Specific Genes in Isolated Nuclei from HeLa Cells in vitro.
Eur. J. Biochem. 62, 353-363.

Vigne, R. und B.R. Jordan, 1977.
Partial Enzyme Digestion Studies on Escherichia coli, Pseudomonas, Chlorella, Drosophila, HeLa and Yeast 5S RNAs Support a General Class of 5S RNA Models.
J. Mol. Biol. 10, 77-86.

Van Keulen, H., R.J. Planta und J. Retel, 1975.
Structure and Transcriptive Specificity of Yeast RNA Polymerase A.
Biochim. Biophys. Acta. 395, 179-190.

Weaver, R.F., S.P. Blatti und W.J. Rutter, 1971.
Molecular Structure of DNA-Dependent RNA-Polymerases (II) from Calf Thymus and Rat Liver.
Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 2994-2999.

Weil, P.A. und S.P. Blatti, 1976.
HeLa Cell Deoxyribonucleic Acid-Dependent RNA Polymerases: Function and Properties of the Class III Enzymes.
Biochemistry 15, 1500-1509.

Weinmann, R., T.G. Brendler, H.J. Raskas und R.G. Roeder, 1976.
Low Molecular Weight Viral RNAs Transcribed by RNA Polymerase III during Adenovirus 2 Infection.
Cell 7, 557-566.

Weinmann, R., H.J. Raskas und R.G. Roeder, 1974.
Role of DNA-Dependent RNA Polymerase II and III in the Transcription of the Adenovirus Genome in KB Cells.
Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 3426-3430.

Weinmann, R., und R.G. Roeder, 1974.
Role of DNA Dependent RNA Polymerase III in Transcription ot the tRNA and 5S RNA Genes.
Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 1790-1794.

Wilhelm, J., D. Dina und M. Crippa, 1974.
A Special Form of DNA-Dependent RNA Polymerase from Oocytes of Xenopus laevis. Isolation and Characterization.
Biochemistry 13, 1200-1208.

Wilson, G.N., A.W. Steggles und A.W. Nienhuis, 1975.
Strand-Selective Transcription of Globin Genes in Rabbit Erythroid Cells and Chromatin.
Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 4835-4839.

Wu, G.-J., 1978.
Adenovirus DNA-Directed Transcription of 5,5S RNA in vitro.
Proc. Nat. Acad. Sci. 75, 2175-2179.

Yamamoto, M. und K.H. Seifart, 1977.
Synthesis of Ribosomal 5S RNA by Isolated Nuclei from HeLa Cells in vitro.
Biochemistry 16, 3201-3209.

Yamamoto, M. und K.H. Seifart, 1978.
Heterogeneity in the 3'-Terminal Sequence of Ribosomal 5S RNA Synthesized by Isolated HeLa Cell Nuclei in vitro.
Biochemistry 17, 457-461.

Zasloff, M. und G. Felsenfeld, 1977.
Use of Mercury-Substituted Ribonucleoside Triphosphates Can Lead to Artefacts in the Analysis of in vitro Chromatin Transcripts.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 598-603.

Zylber, E.A. und S. Penman, 1971.
Products of RNA Polymerase in HeLa Cell Nuclei.
Proc. Nat Acad. Sci. 68, 2861-2865.

Lebenslauf

4.8.1949	geboren in Haldensleben als Tochter der Eheleute Ruth Jonas geb. Lüdtke und Heinz Jonas.
1956-1960	Besuch der Linteler-Schule in Norden und der Volksschule am Staakenweg in Oldenburg
1960-1968	Besuch der Cäcilienschule in Oldenburg, neusprachlich-mathematisches Mädchen-gymnasium
11.6.1968	Reifeprüfung im neusprachlichen Zweig der Cäcilienschule
1968-1970	Praktikantenzeit in der Einhorn-Apotheke in Wilhelmshaven
28.9.1970	Pharmazeutisches Vorexamen in Oldenburg
1970-1973	Pharmaziestudium an der Philipps-Universität in Marburg
5.10.1973	Pharmazeutisches Staatsexamen
1974-1977	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität in Marburg
1.11.1974 - Nov. 1976	Mitarbeit an einem Forschungsprojekt zur Isolierung der ribosomalen Gene aus Rattenleberkernen und HeLa-Zellen am Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. K.H. Seifart
Nov. 1976	Beginn der vorliegenden Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. K.H. Seifart.

Meine akademischen Lehrer waren:

Dehnicke, Ebel, Eger, Haake, Hartke, Kating, Koransky,
List, Nultsch, Otto, Richter, Schiff, Schmitz,
Seitz, Walcher, Willuhn

Aziz, Beato, Braun, Gallwitz, Hensel, Karlson, v. Kraft,
Niessing, Schachtschabel, Schneider, Schmid, Schwick,
Seifart, Wiegandt.